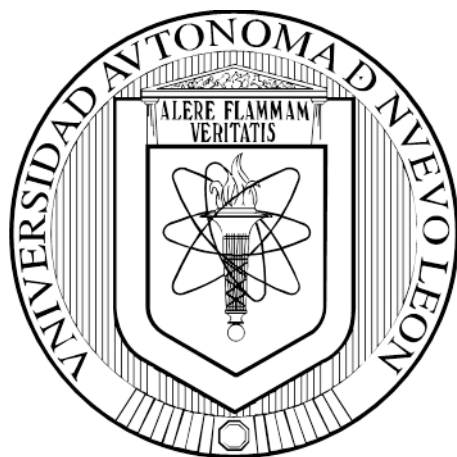


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE MEDICINA**



**“EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTITUMORAL DE UN SISTEMA  
ADYUVANTE BASADO EN SEÑALES DE ENVÍO Y RETENCIÓN DE  
ANTÍGENOS EN RETÍCULO ENDOPLÁSMICO”**

**POR**

**M.C. JOSÉ JUAN PÉREZ TRUJILLO**

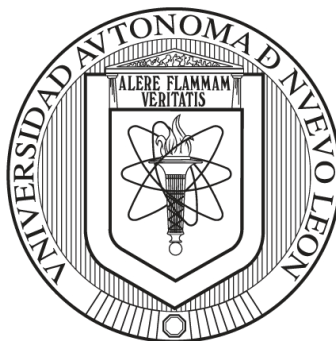
**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MORFOLOGÍA**

**NOVIEMBRE, 2016**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**DEPARTAMENTO DE HISTOLOGÍA**



**“EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTITUMORAL DE UN SISTEMA  
ADYUVANTE BASADO EN SEÑALES DE ENVÍO Y RETENCIÓN DE  
ANTÍGENOS EN RETÍCULO ENDOPLÁSMICO”**

**POR:**

**M.C. JOSÉ JUAN PÉREZ TRUJILLO**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MORFOLOGÍA**

**NOVIEMBRE DE 2016**

**“EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTITUMORAL DE UN SISTEMA  
ADYUVANTE BASADO EN SEÑALES DE ENVÍO Y RETENCIÓN DE  
ANTÍGENOS EN RETÍCULO ENDOPLÁSMICO”**

Aprobación de tesis:

---

**Dra. C. María de Jesús Loera Arias**  
Directora

---

**Dr. C. Roberto Montes de Oca Luna**  
Co-Director de tesis

---

**Dra. C. Odila Saucedo Cárdenas**  
Comisión de tesis

---

**Dra. C. Aracely García García**  
Comisión de tesis

---

**Dr. C. Humberto Rodríguez Rocha**  
Comisión de tesis

---

**Dra. Med. Raquel Garza Guajardo**  
Subdirectora de Estudios de Posgrado

Monterrey, N.L.

Noviembre de 2016

**“Evaluación del efecto antitumoral de un sistema adyuvante basado en señales de envío y retención de antígenos en retículo endoplásmico”**

POR

JOSÉ JUAN PÉREZ TRUJILLO

El presente proyecto fue desarrollado en el Departamento de Histología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León bajo la dirección de la Dra. María de Jesús Loera Arias y la co-dirección del Dr. Roberto Montes de Oca Luna.

---

Dra.C. María de Jesús Loera Arias  
Directora

---

Dr. C. Roberto Montes de Oca Luna  
Co-Director

MONTERREY, N.L.

NOVIEMBRE 2016

*Todo es lo mismo*

## AGRADECIMIENTOS

A mis padres, José Juan y Rosa Laura, mis hermanos Jesús Jaime y Jessica Janeth, los sobrinos Ari y Naomi, a mis abuelas Paula<sup>+</sup> y Melva.

A la Dra. María de Jesús Loera, por haberme guiado y brindado enseñanzas durante mi formación, así como por su amistad y por tenerme una increíble paciencia.

Al Dr. Roberto Montes de Oca, por los consejos, sus seminarios y estar al pendiente de las necesidades para el desarrollo del proyecto.

A mi comisión de tesis, la Dra. Odila Saucedo, Dra. Aracely García y Dr. Humberto Rodríguez por asesorarme en las diversas situaciones que se me presentaron.

Al Dr. Jaime García, Dr. Juan Carlos Segoviano, y Dr. Arnulfo Villanueva, por sus consejos para la mejora de la metodología del proyecto.

Al *Máster* José Luis Méndez, Dr. José Alberto Valadez y Dra. Deyanira Quistán por continuar brindándome consejos, experiencias y sobre todo amistad.

A Conacyt por el apoyo financiero para la realización del presente trabajo.

A toda la raza que me acompañó en el laboratorio, los niños: Alejandro González, Beto Barrón, Daniel-San, David Martínez, Elvis Martínez, Gabo Figueroa, Iván Martínez, Jorge Sepúlveda, Juan Castillo, Mike Parga, y Rudy Garza; y las niñas Abigail Robles, Ana Duarte, Brenda Blum, Fanny Ramírez, Marce Ramírez, y Yessica Sánchez. Así como al personal del laboratorio, en especial a Don Pancho, Juany, Alicia, Ángel, Luis e Iván.

Y a los amigos, en especial a Isidro, Mi-Yagui, May, Lu Menchaca, Luigi Olguín, Luisillo Ochoa, Crys Sierra, Rulo Garza y Ana Rousse.

E inesperadamente a *Sheila Villa*, por todo su amor y apoyo incondicional..

## RESUMEN

M.C. José Juan Pérez Trujillo.  
Universidad de Nuevo León  
Facultad de Medicina.

**Fecha de titulación:** Noviembre 2016

**Título del estudio:** “EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTITUMORAL DE UN SISTEMA ADYUVANTE BASADO EN SEÑALES DE ENVÍO Y RETENCIÓN DE ANTÍGENOS EN RETÍCULO ENDOPLÁSMICO”

**Páginas en el estudio:** 108

**Candidato para el grado de Doctor en  
Ciencias con Orientación en Morfología**

**Área de estudio:** Morfología

### **Propósito y Método del Estudio:**

El desarrollo del cáncer cervical está asociado a la infección del Virus del Papiloma Humano (VPH) y la expresión de sus oncoproteínas E6 y E7. La generación de vacunas antitumorales ha brindado resultados alentadores con respuestas inmunes capaces de reducir masas tumorales *in situ* y metástasis, además de reducir la re-incidencia. Una estrategia para que las vacunas generen una mejor respuesta inmune específica a antígenos de tumor es el enviar dichos antígenos al retículo endoplásmico mediante la fusión a proteínas chaperonas residentes del orgánulo, un ejemplo es la calreticulina (CRT). Sin embargo, otros autores han reportado la sobreexpresión de calreticulina como un marcador de mal pronóstico en diversos padecimientos. Por lo cual, el propósito del estudio es analizar el efecto antitumoral de las vacunas de ADN basadas en el envío y retención de los antígenos mutantes E6 y E7 del VPH en retículo endoplásmico a través del uso de las señales SP y KDEL, eliminando el uso de la proteína calreticulina. Para esto, se construyeron las vacunas SP-E6E7m-KDEL y hCRT-E6E7m, donde se comparó su eficacia de enviar los antígenos a retículo endoplásmico así como su capacidad de despertar una respuesta inmune específica a antígeno y evaluarlas en un modelo tumoral murino mediante el implante de la línea tumoral TC-1 que expresa las oncoproteínas E6 y E7 del VPH. Posteriormente, también se analizó la respuesta inmune antitumoral generada por el uso de cada señal, para lo cual se realizaron comparativas entre las vacunas SP-E6E7m, E6E7m-KDEL y SP-E6E7m-KDEL.

### **Conclusiones y Contribuciones:**

Con los resultados obtenidos se logró constatar que la estrategia de envío y retención de antígenos en retículo endoplásmico es eficaz para generar una respuesta inmune específica en un esquema de vacunas de ADN, donde la inmunización con la fusión del antígeno E6E7m a SP y KDEL es capaz de generar un efecto antitumoral similar a la fusión a calreticulina completa, y que es necesario el uso de la señal de retención (KDEL) en el antígeno E6E7m enviado a retículo endoplásmico para obtener el máximo efecto antitumoral. La contribución con el trabajo realizado es generar el conocimiento de una estrategia que permita aumentar la inmunogenicidad de antígenos y esperaríamos que esto pueda ser aplicado en la resolución de otros tipos de enfermedades y no solo limitarse a lo evaluado en el modelo de cáncer cervical.

---

**Dra. María de Jesús Loera Arias**  
**Directora de Tesis**

## ABSTRACT

The development of cervical cancer is associated with human papillomavirus (HPV) infection and the expression of its E6 and E7 oncoproteins. The generation of antitumor vaccines has provided encouraging results with immune responses capable of reducing tumor masses in situ and metastasis, in addition to reducing re-incidence. One strategy for vaccines to generate a better immune response specific to tumor antigens is sending such antigens to the endoplasmic reticulum by fusing them to resident organelle chaperone proteins, for example, calreticulin (CRT). However, other authors have reported overexpression of calreticulin as a marker of poor prognosis in various conditions. Therefore, the purpose of the study is to analyze the antitumor effect of the DNA vaccines based on the sending and retention of the mutant E6 and E7 antigens of HPV in endoplasmic reticulum through the use of the SP and KDEL signals, eliminating the use of the calreticulin. For this, the SP-E6E7m-KDEL and hCRT-E6E7m vaccines were constructed, comparing their efficacy of sending the antigens to endoplasmic reticulum as well as their ability to elicit an antigen-specific immune response. Also, these vaccines were evaluated on a murine tumor model through Implantation of the TC-1 cells, an tumor cell line that express the HPV E6 and E7 oncoproteins. Subsequently, the antitumor immune response generated by the use of each signal was analyzed by comparing the SP-E6E7m, E6E7m-KDEL and SP-E6E7m-KDEL vaccines.

The results showed that the strategy of sending and retaining antigens in endoplasmic reticulum is effective to generate a specific immune response under a DNA vaccination scheme, where immunization with the fusion of E6E7m antigen to SP and KDEL is capable to generate an antitumor effect similar to fusion to complete calreticulin, and that it is necessary to use the retention signal (KDEL) on the E6E7m antigen sent to endoplasmic reticulum to obtain the maximum antitumor effect. The contribution of this study is to generate knowledge about a strategy that allows to increase the immunogenicity of antigens and we would hope that this can be applied for the resolution of other types of diseases and not only to be limited to cervical cancer.



## ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES.....	3
Cáncer cervical .....	3
Virus del Papiloma Humano .....	5
Malignización celular por VPH.....	8
Oncoproteínas E6 y E7 del VPH .....	10
Respuesta inmune contra VPH.....	12
Respuesta inmune humoral contra VPH.....	13
Respuesta inmune celular contra VPH .....	14
Presentación de antígenos por el Complejo Mayor de Histocompatibilidad.....	17
Mecanismos de evasión a la presentación de antígenos por el VPH .....	20
Vacunas en la actualidad contra VPH y cáncer cervical .....	22
Vacunas con versiones no oncogénicas de E6 y E7 .....	23
Fusión de antígenos a Calreticulina para potenciar la respuesta inmune .....	26
Sistema adyuvante basado en el envío de antígenos a retículo endoplásmico .....	28
Inmunización con ADN por biobalística.....	30
HIPÓTESIS.....	33
OBJETIVO GENERAL.....	33
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	34
MATERIALES.....	35
Plásmidos .....	35
Péptidos .....	35
Animales.....	36
Líneas celulares .....	36
Bacterias.....	36
Cultivo Celular .....	37
Cultivo Bacteriano .....	38
Kits .....	38
Enzimas .....	39
Anticuerpos .....	40
Reactivos .....	40

Soluciones .....	41
Equipo de laboratorio .....	42
Consumibles.....	44
METODOLOGÍA .....	45
Diseño de las construcciones de ADN .....	45
Reacción en cadena de la polimerasa .....	46
Digestión con enzimas de restricción .....	46
Ligación de genes en plásmidos .....	47
Obtención de bacterias <i>Escherichia coli</i> calciocompetentes .....	47
Transformación de bacterias <i>Escherichia coli</i> calciocompetentes.....	48
Purificación de plásmidos.....	48
Cultivo celular.....	49
Detección de la expresión de las proteínas recombinantes por Western blot .....	50
Detección de la localización subcelular de las proteínas recombinantes por inmunofluorescencia .....	51
Preparación de cartuchos de ADN para inmunización por biobalística .....	52
Estimulación de esplenocitos .....	53
Detección de INF- $\gamma$ por ELISA .....	54
Detección de INF- $\gamma$ específico a E6 y E7 por citometría de flujo.....	54
Detección de INF- $\gamma$ específico a E7 por ELISpot.....	55
Ensayo antitumoral profiláctico .....	56
Ensayo antitumoral terapéutico en modelo subcutáneo .....	57
Ensayo antitumoral terapéutico en modelo de metástasis .....	57
Detección de expresión de LacZ .....	58
Inclusión de tejidos en parafina .....	58
Análisis estadístico .....	59
RESULTADOS .....	60
La fusión del antígeno E6E7m a las señales SP y KDEL promueve su envío a retículo endoplásmico .....	60
Las construcciones de ADN se expresan en la epidermis tras su administración por biobalística	65
La fusión del antígeno E6-E7 a SP y KDEL es capaz de generar un efecto antitumoral similar a la fusión a calreticulina completa .....	67
La fusión del antígeno E6E7m a las señales SP ó KDEL por separado presenta distintos patrones de expresión.....	71

Son necesarias ambas señales (SP y KDEL) para obtener el máximo efecto antitumoral.....	77
DISCUSIÓN .....	85
CONCLUSIONES .....	92
APORTACIONES .....	93
PERSPECTIVAS .....	94
REFERENCIAS.....	95
APÉNDICE .....	106

## LISTA DE ABREVIATURAS

%	Por ciento
°	Grado angular
°C	Grados centígrados
µg	Microgramo
µl	Microlitro
µM	Micromolar
µm	Micrómetro
aa	Aminoácido
AAT	Antígenos asociados a tumor
ACK	Amonio-Cloruro-Potasio (Buffer, Nomenclatura química)
Ad	Adenovirus
ADN	Ácido desoxirribonucleico
aprox	Aproximadamente
BSA	Albúmina de Suero Bovino, por sus siglas en inglés
CC	Cáncer cervical
CD	Cluster de diferenciación
CMV	Citomegalovirus
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
CPA	Célula presentadora de antígenos
CRT	Calreticulina
cCRT	Calreticulina de conejo
hCRT	Calreticulina de humano
CTL	Linfocitos T Citotóxicos
DAPI	4',6-DiAmidina-2-FenilIndol
DMSO	Dimetilsufoxido
EDTA	Ácido Etilendiaminotretaacético
ELISA	Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas, por sus siglas en inglés
FITC	Isotiocianato de fluoresceína, por sus siglas en inglés
FBS	Suero Fetal Bovino, por sus siglas en inglés
HRP	Peroxidasa de rábano, por sus siglas en inglés
IFN	Interferón
IgG	Inmunoglobulina G
IL	Interleucina
iv	Intravenosa
kb	Kilobase

kDa	Kilodalton
KDEL	Lisina-Acido aspártico, Acido glutámico, Leucina (Nomenclatura de aminoácidos)
LCR	Región larga de control, por sus siglas en inglés
LPM	Litros por minuto
mA	Miliampere
mg	miligramo
MHC	Complejo de Histocompatibilidad , por sus siglas en inglés
min	Minuto
ml	Mililitro
mM	Milimolar
mm	Milímetro
mm <sup>3</sup>	Milímetro cúbico
ng	Nanogramo
NK	Células asesinos naturales, por sus siglas en inglés
nM	Nanomolar
nm	Nanómetro
OD	Densidad óptica, por sus siglas en inglés
ORF	Marco de lectura abierto, por sus siglas en inglés
ORI	Origen de replicación
RIPA	Radioinmunoprecipitación (Buffer)
p<	Grado de significancia
pb	Pares de base
PBS	Buffer Fosfato Salino, por sus siglas en inglés
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa, por sus siglas en inglés
PE	Ficoeritrina, por sus siglas en inglés
PFA	Paraformaldehído
pg	picogramo
pH	Potencial de hidrógeno
pRb	Proteína Retinoblastoma
psi	Libra por pulgada cuadrada, por sus siglas en inglés
PVDF	Polivinilidenofluoruro
PVP	Polivinilpirrolidona
RE	Retículo endoplásmico
rpm	Revoluciones por minuto
sc	subcutáneo
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio, por sus siglas en inglés
seg	Segundo
SP	Péptido señal, por sus siglas en inglés

TAE	Tris-Acetato-EDTA (Buffer)
TBS	Buffer de Tris Salino, por sus siglas en inglés
Th	Linfocito T cooperador, por sus siglas en inglés
TNF	Factor de necrosis tumoral, por sus siglas en inglés
TRC	Recetor de linfocito T, por sus siglas en inglés
U	Unidades
UV	Ultravioleta
VLP	Partículas similares a virus, por sus siglas en inglés
VPH	Virus del Papiloma Humano
X	Indica concentración/magnificación

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Organización del genoma del VPH.
- Figura 2. Expresión de genes del VPH durante infección productiva.
- Figura 3. Proceso de malignización celular por las oncoproteínas E6 y E7 del VPH.
- Figura 4. Respuesta citotóxica por linfocitos CD8+ mediante reconocimiento del MHC-I.
- Figura 5. Cargado de epítomos al MHC-I.
- Figura 6. Chaperonas del complejo de carga de antígenos para MHC-I.
- Figura 7. Diagrama de flujo de proteína con señal SP o SP-KDEL.
- Figura 8. Esquema de las construcciones de ADN del antígeno E6E7m fusionado a CRT o SP-KDEL.
- Figura 9. Análisis por PCR y Western Blot de las construcciones E6E7m con CRT o SP-KDEL clonadas en pShuttle-CMV.
- Figura 10. Análisis por microscopia confocal de la distribución celular del retículo endoplásmico utilizando el marcador calnexina.
- Figura 11. Análisis por microscopia confocal de la distribución subcelular del antígeno E6E7m tras fusión a CRT o SP-KDEL.
- Figura 12. Detección de la expresión del plásmido pcDNA4/TO/lacZ transfectado en la piel por biobalística.
- Figura 13. Detección de IFN- $\gamma$  específico por ELISA de esplenocitos en respuesta a inmunización con E6E7m fusionado a CRT o SP-KDEL.
- Figura 14. Efecto antitumoral terapéutico por la inmunización con las construcciones de ADN del antígeno E6E7m fusionado a CRT o SP-KDEL.
- Figura 15. Cambios morfológicos en los focos tumorales presentes en pulmones derivados del ensayo antitumoral terapéutico.
- Figura 16. Esquema de las construcciones de ADN del antígeno E6E7m fusionado con SP y/o KDEL.
- Figura 17. Mapa de SP-E6E7m-KDEL y sus sitios de restricción.
- Figura 18. Diagrama para la obtención de E6E7m-KDEL y SP-E6E7m.

Figura 19. Diagrama para obtención de SP-E6E7m-KDEL, SP-E6E7m, E6E7m-KDEL y E6E7m en pUMVC4a.

Figura 20. Detección de la expresión por Western blot de las construcciones E6E7m fusionadas a SP y/o KDEL en pUMVC4a.

Figura 21. Análisis por microscopía confocal de la distribución subcelular del antígeno E6E7m tras fusión a SP y/o KDEL.

Figura 22. Detección de IFN- $\gamma$  específico por ELISA de esplenocitos en respuesta a inmunización con E6E7m fusionado a SP y/o KDEL

Figura 23. Detección de población CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> en esplenocitos en respuesta a inmunización con E6E7m fusionado a SP y/o KDEL

Figura 24. Detección de IFN- $\gamma$  específico por ELISpot de mononucleares derivados de esplenocitos en respuesta a inmunización con E6E7m fusionado a SP y/o KDEL.

Figura 25. Efecto antitumoral profiláctico por la inmunización con las construcciones de ADN del antígeno E6E7m fusionado a SP y/o KDEL.

Figura 26. Efecto antitumoral terapéutico por la inmunización con las construcciones de ADN del antígeno E6E7m fusionado a SP y/o KDEL.

Figura 27. Efecto antitumoral por la inmunización con las construcciones SP-E6E7m y SP-E6E7m-KDEL.



## INTRODUCCIÓN

---

En la actualidad se presenta un gran número de fallecimientos por diversos tipos de cáncer, por lo que es necesario generar terapias que ayuden a la resolución del padecimiento. Actualmente los tratamientos son remoción quirúrgica del tumor, radioterapia y quimioterapia; sin embargo, puede generarse metástasis del cáncer hacia tejidos distales permitiendo el escape y persistencia de las células tumorales en el organismo. Aunado a lo anterior, dichas células sobrevivientes son capaces de desarrollar mecanismos de resistencia a los tratamientos provocando una mayor persistencia del cáncer que afecta la calidad de vida del paciente.

La respuesta inmune contra los tumores ha demostrado que es capaz de reducir masas tumorales in situ y la eliminación de focos tumorales durante la metástasis, además de generar una respuesta de memoria capaz de reducir la reincidencia. Para lograr esto es necesario generar vacunas capaces de despertar una respuesta inmune celular específica contra antígenos de tumor. Para esto, es necesario una eficiente presentación del antígeno al sistema inmune a través del cargado de sus epítomos al MHC-I en el retículo endoplásmico; sin embargo, la expresión del MHC-I se ve disminuida durante los procesos oncogénicos. Una estrategia que ha demostrado generar resultados prometedores es la fusión de los antígenos a proteínas chaperonas del retículo endoplásmico, esto bajo la premisa de aumentar la disponibilidad y procesamiento de los antígenos y por ende su

presentación por MHC-I. La calreticulina es la chaperona que ha sido mas estudiada y que ha generado los mejores resultados. A pesar que no se han reportado efectos adversos por dicha estrategia, en estudios clínicos se ha asociado la sobreexpresión de calreticulina con la metástasis del cáncer a través de sus funciones de regulación del calcio intracelular y motilidad celular.

La importancia de nuestro trabajo es que determinamos que la estrategia puede simplificarse ya que no es necesaria la fusión de antígeno a proteínas chaperonas completas, eliminando así los posibles riesgos por la sobreexpresión de proteínas. En este trabajo se demuestra que la inmunización con el antígeno E6E7m fusionado a las señales de envío y retención en retículo endoplásmico obtenidas de la calreticulina humana, SP y KDEL, respectivamente, es capaz de generar una respuesta antitumoral similar a la obtenida usando la fusión del mismo antígeno a calreticulina completa. Así mismo, se determinó que es necesaria la señal de retención KDEL para obtener el máximo efecto antitumoral.

Nuestro trabajo fue basado en un modelo de cáncer por VPH, sin embargo, nosotros esperamos que el impacto de nuestros resultados permitan colaborar y aplicar dicha estrategia para la mejora de respuesta inmune específica hacia otros antígenos implicados en diversos padecimientos.

## ANTECEDENTES

---

### Cáncer cervical

El cáncer cervical (CC) consiste en la formación de pequeñas displasias en el epitelio del cuello uterino, las cuales van evolucionando lentamente de leves a severas culminando en una malignización de las células epiteliales generando un tumor *in situ* en el epitelio cervical. Éste último puede evolucionar a cáncer invasor cuando traspasa la membrana basal del epitelio haciendo metástasis a tejidos adyacentes y distales (Petignat and Roy 2007).

El cáncer cervical es considerado como el tercer tipo de cáncer predominante en mujeres a nivel mundial, y como la segunda causa de muerte por cáncer en países en vías de desarrollo (Jemal et al. 2011). Aproximadamente el 80% de los casos en estadios tempranos y un 60% en estadios avanzados, pueden ser curados utilizando cirugía para remoción del tumor en conjunto con quimiorradioterapia. A pesar de ser un cáncer que puede prevenirse y ser curable en los estadios iniciales del padecimiento, sigue siendo un problema de salud pública en múltiples países que se encuentran en vías de desarrollo, tales como India, Brasil y México, entre otros. Así también, la reiniciencia del cáncer suele generar casos de peor pronóstico, ya que muchos de estos derivan de células que han sobrevivido a los tratamientos previos y que originaron resistencia a los mismos, reduciendo

las opciones terapéuticas y/o exponiendo al paciente a tratamientos con mayores reacciones adversas (Petignat and Roy 2007).

En México los procedimientos empleados para la detección del cáncer cervical consisten en un análisis citológico de cérvix (tinción de Papanicolaou) y, en los casos que no se pueda confirmar la presencia de lesiones pre-cancerosas, se procede a solicitar pruebas de PCR y captura de híbridos para el Virus del Papiloma Humano como técnicas confirmatorias. En nuestro país se detectó que hay una cobertura ineficaz (54%) de los programas de detección oportuna, así como la baja participación de la población en dichos programas, traduciéndose en un futuro aumento en el número de casos de cáncer cervical (Secretaría de Salud, 2006).

El virus del Papiloma Humano (VPH) ha sido asociado como el principal factor (más no como un factor determinante) involucrado en el desarrollo de displasias en el epitelio cervical, esto debido a que en el >98 % de los casos de cáncer cervical se ha detectado la presencia del virus, principalmente el VPH-16 y VPH-18, no obstante no todos los pacientes con VPH desarrollan cáncer. Por lo tanto, cabe recordar que el cáncer es definido como un padecimiento multifactorial, por lo que es necesario que se establezcan otras condiciones idóneas o determinantes para su desarrollo, tales como inmunosupresión, inflamación crónica, factores hormonales, etc (Walboomers et al. 1999; Shillito 2006).

El sistema inmunológico protege al organismo de una gran gama de microorganismos y participa en la eliminación de células que han sufrido compromiso por infección o transformación oncogénica. En la actualidad se cuentan con las vacunas Gardasil

y Cervarix que han logrado despertar respuestas inmunes efectivas contra las partículas virales del VPH, evitando así la infección y el posible desarrollo de cáncer cervical. Dichas vacunas ya han sido aplicadas como profilaxis en la población femenina otorgando excelentes resultados. Por lo tanto, dichas vacunas solo son efectivas en pacientes jóvenes de 9-12 años principalmente, aunque el rango puede aumentar hasta jóvenes de 18 años que no hayan estado en contacto con el VPH; así mismo, en grupos de mayor edad no se ha encontrado evidencia de que su uso aporte beneficios (Baseman and Koutsky 2005; M. Stanley 2010).

En la actualidad no existen vacunas terapéuticas para las personas que han sido infectadas por VPH y que su lesión ha degenerado en cáncer cervical. Los tratamientos que se utilizan actualmente para el cáncer cervical son la remoción quirúrgica del tumor, la radioterapia y quimioterapia, los cuales terminan siendo tratamientos que afectan la calidad de vida del paciente, ya que presentan una baja tasa de éxito y en muchos casos se sufre de recaídas a corto plazo, fluctuando de 10% hasta un 72% según la población y los factores de riesgos (Peiretti et al. 2012). Por lo que es ideal el desarrollo de una vacuna terapéutica que genere una respuesta inmune sistémica que elimine la infección y células tumorales, incluso en los casos de metástasis.

### Virus del Papiloma Humano

El Virus del Papiloma Humano (VPH) pertenece a la familia *Papillomavirus* que consiste en virus no envueltos de doble cadena de ADN circular. Esta familia de virus infecta

a un amplio espectro de mamíferos incluyendo al hombre; sin embargo, también se ha reportado su presencia en aves, tortugas y serpientes (Lange et al. 2011).

Actualmente se han descrito más de 180 tipos de Papilomavirus distribuidos en 29 géneros, de los cuales 120 son aislados de humanos. La clasificación filogenética de los tipos de Papilomavirus está basada en las regiones altamente conservadas del gen L1, y en los casos en que se presenta una diferencia  $>10\%$  se considera un nuevo tipo viral (Bernard et al. 2010). Así también, los Papilomavirus se clasifican en su tropismo al epitelio que infecten, ya sea cutáneo (manos, pies) o mucoso (garganta, tracto respiratorio, zona anogenital), siendo estos últimos los de mayor relevancia clínica ya que son los que han demostrado mayor capacidad oncogénica (Walboomers et al. 1999).

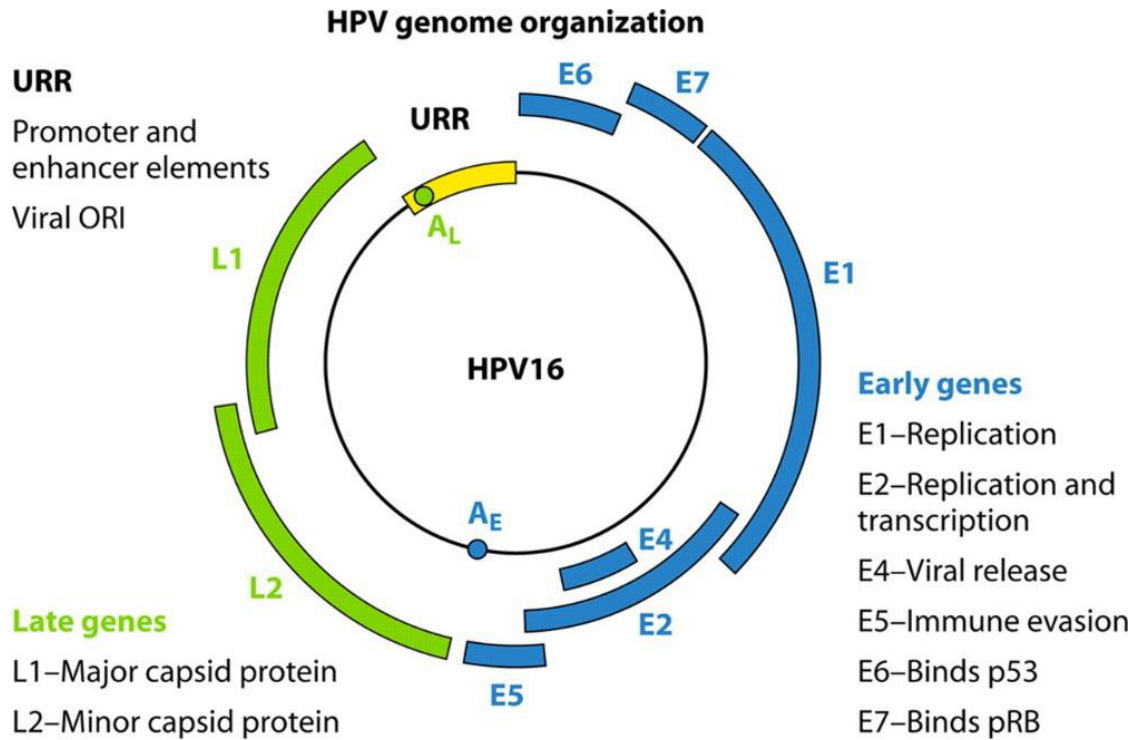
Para la infección por VPH es necesario que la partícula viral infecte a los queratinocitos en la capa basal del epitelio escamoso manteniendo su genoma de forma episomal en el núcleo y dependiente del ciclo de diferenciación de la célula. La replicación viral se va generando conforme avanza la diferenciación de la epidermis hasta liberar la progenia viral tras la descamación de los queratinocitos. Sin embargo, en ocasiones el genoma viral se integra en la célula hospedera generando pequeñas masas tumorales benignas (verrugas); no obstante, éstas pueden posteriormente progresar en tumores malignos (Münger et al. 2004).

Los primeros indicios de la posible capacidad oncogénica de VPH fueron registrados para el tipo 16 (Dürst et al. 1983), y el tipo 18 (Boshart et al. 1984). Esto fue obtenido a través de estudios retrospectivos en biopsias tumorales de cáncer cervical, dando como

resultado una clasificación de tipos de VPH bajo y alto riesgo tumoral. Los tipos de VPH catalogados como de alto riesgo oncogénico son el 16, 18, 31, 33, 39, 45, 52, y 58 (Walboomers et al. 1999).

El genoma del VPH está conformado por alrededor de 8 kb, y se divide en tres regiones no codificante, temprana y tardía (Zheng and Baker 2006). En la figura 1 se muestra la organización del genoma viral y a continuación se describen cada una de estas regiones:

- Región no codificante: es una región de alrededor de 800 pb también conocida como región larga de control o región reguladora (LCR y URR, respectivamente, por sus siglas en inglés), esto debido a que en ella se encuentran secuencias promotoras, potenciadoras y silenciadoras.
- Región temprana: se encuentra conformada por el marco abierto de lectura (ORF, por sus siglas en inglés) de las proteínas E1, E2, E4, E5, E6 y E7. Estas proteínas son las primeras en expresarse durante la infección, de ahí la denominación E (por “early”, del inglés) o tempranas. También se ha denominado ORF para E3 y E8; sin embargo, solo se han detectado estos marcos de lectura en ciertos tipos de VPH (Han et al. 1998).
- Región tardía: la conforman los ORF para las proteínas estructurales L1 y L2 de la cápside del virus. De igual manera, la denominación L deriva de “Late” (del inglés) o tardía esto debido a que la expresión de estos genes ocurre en las últimas capas del epitelio cervical previo a la liberación de la progenia viral.



**Figura 1. Organización del genoma del VPH.** El genoma del Virus del Papiloma Humano se encuentra dividido en 3 regiones: URR, genes tempranos (E) y genes tardíos (L).

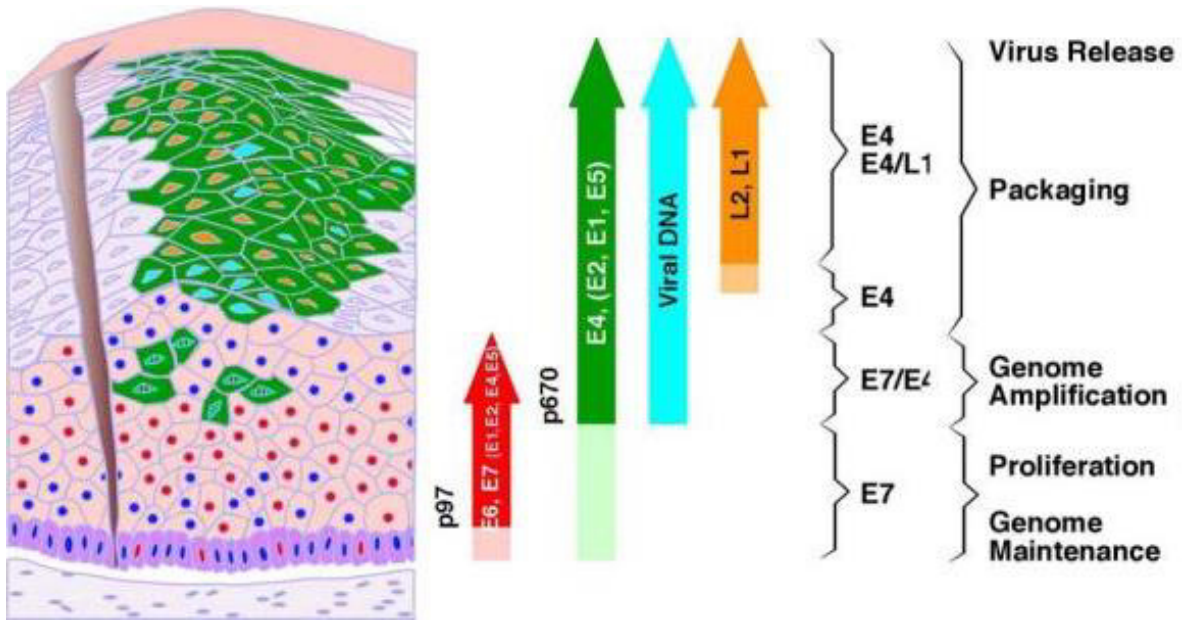
### Malignización celular por VPH

Tras la infección por VPH en los queratinocitos basales del epitelio cervical se inicia la expresión y funcionamiento de las proteínas tempranas (E). Las funciones de las proteínas E1 y E2 son la replicación del genoma viral y la regulación temprana de la transcripción, mientras que E4 está involucrada en el colapso de los filamentos intermedios de citoqueratina produciendo perturbaciones en la morfología e integridad del epitelio y E5 aumenta la tasa de proliferación de la célula hospedera. Sin embargo, las proteínas virales E6 y E7 son las principales responsables de la transformación celular mediante la inactivación de las proteínas supresoras de tumor, p53 y pRb, respectivamente.



Posteriormente, conforme los queratinocitos se acercan a la periferia del epitelio cervical se inicia la expresión de las proteínas virales L1 y L2, las cuales son las proteínas estructurales que forman la cápside de la partícula viral (Figura 2). Durante la infección se desarrollan pequeñas lesiones benignas (verrugas) debido a que el ciclo viral se encuentra regulado y el genoma viral se encuentra extracromosomal; no obstante, dichas lesiones pueden degenerar en la malignización de las células afectadas como resultado de una desregulación del ciclo viral por factores aún no elucidados (Zheng and Baker 2006).

Se ha reportado que en algunas ocasiones el genoma viral se llega a integrar al genoma de la célula, y que durante dicho proceso el gen E2 es escindido provocando la desregulación en los ciclos de transcripción de E6 y E7 induciendo la transformación celular y pequeñas lesiones tumorales malignas (Demeret et al. 1997). Incluso al gen E2 se le ha atribuido funciones de gen supresor de tumores por la función previamente mencionada, así como la función apoptótica tras su sobreexpresión en estudios *in vitro* (Bellanger et al. 2011). A pesar que el proceso específico para la formación de células malignizadas por VPH no es del todo conocido, se ha descrito a E6 y E7 como las principales proteínas con propiedades oncogénicas responsables de la formación del cáncer cervical (Walboomers et al. 1999).



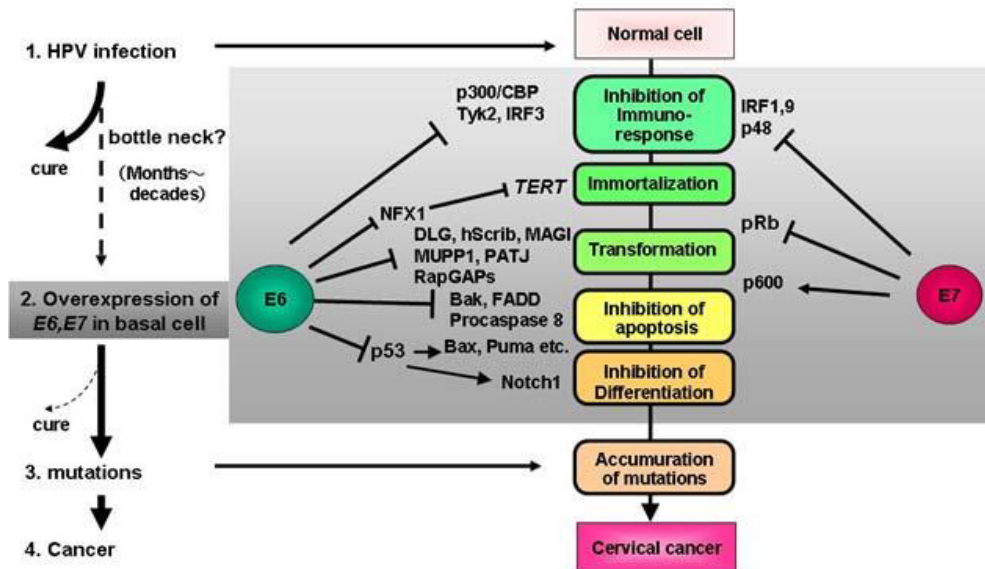
**Figura 2. Expresión de genes del VPH durante infección productiva.** En la imagen se muestra el patrón de expresión de los genes virales conforme progresa la infección desde los queratinocitos basales (Egawa et al. 2015).

### Oncoproteínas E6 y E7 del VPH

La mayoría de los estudios en la transformación celular por E6 y E7 se enfocan en los VPH de alto riesgo (principalmente VPH-16 y VPH-18), ya que dicha clasificación está basada en la afección y actividad de estas proteínas para con sus respectivos ligandos, los genes supresores de tumor p53 y pRb, respectivamente. La immortalización de las células no implica su malignización ya que éstas no presentan la capacidad de formar tumores en murinos desnudos; sin embargo, conforme avanzan el número de divisiones de las células afectadas es probable que se presente una acumulación de mutaciones y activación de oncogenes que culminen en la formación de tumores malignos (Mantovani and Banks 2001).

La oncoproteína E6 está compuesta por 151 aminoácidos y contiene dos motivos de dedos de zinc, Cys-X-X-Cys en su estructura. Se descubrió que dicha proteína tiene la capacidad de inmortalizar diversas líneas celulares y que dicha acción era dependiente de la conservación de las cisteínas Cys-66 y Cys-136 presentes en dichos motivos. El mecanismo de acción de E6 es mediante la unión al extremo N-terminal de la ligasa E6AP, dicho complejo es capaz de ubiquitinar a p53 enviándola a su degradación por proteosoma. A pesar que la capacidad transformante de E6 es relativamente baja (al ser comparada con E7) y que es dependiente de la co-expresión de otros oncogenes, ha sido catalogada como un factor importante en el desarrollo de cáncer cervical. Así mismo, se determinó que E6 de VPH-16 presentaba mayor interacción con p53 que los VPH de bajo riesgo, e inclusive que el VPH-18 (Elbel et al. 1997; Mantovani and Banks 2001).

Por otro lado, la oncoproteína E7 es la principal responsable de la capacidad transformante, y es el atributo de mayor importancia en la clasificación de los tipos de VPH de alto riesgo. Tiene una longitud aproximada de 98 aminoácidos, y presenta un motivo de Cys-X-X-Cys para su interacción con el ADN siendo capaz de transformar líneas celulares. Su mecanismo de acción se inicia tras la unión de E7 con la proteína retinoblastoma (pRb), la cual es ubiquitinizada y posteriormente degradada por proteosoma, provocando la liberación del factor de transcripción E2F y por ende el avance del ciclo celular (Boyer, Wazer, and Band 1996). También se ha reportado que E7 es capaz de desestabilizar los centrómeros de los cromosomas durante la división mitótica, aumentando la inestabilidad del genoma y las posibles mutaciones que conlleven a la malignización celular (Duensing et al. 2000).



**Figura 3. Proceso de malignización celular por las oncoproteínas E6 y E7 del VPH.** Se muestran las interacciones de E6 y E7 y los procesos celulares que conllevan al cáncer cervical (“Oncogenic Activity of HPV Genes << Group for Cancer Development and Progression Division of Virology << National Cancer Center Research Institute” 2016).

### Respuesta inmune contra VPH

La infección por VPH comúnmente se inicia en los queratinocitos de las capas basales del epitelio cervical; sin embargo, también puede darse la infección en tejidos ajenos al área genital como en la región orofaríngea (Garland 2015). Los queratinocitos son catalogados como presentadores no profesionales de antígeno, ya que estos no son capaces de expresar moléculas coestimuladoras como CD80, CD86, ICAM-1 así como el MHC-II (Steele et al. 2002); sin embargo, estos representan el primer frente para la activación de la respuesta inmune para la eliminación del VPH a través de la producción de citocinas proinflamatorias como el Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e Interferón gama (IFN- $\gamma$ ), así como

quimioatrayentes (CXCL9), inhibiendo la replicación viral y estimulando la migración de leucocitos al sitio de infección para la eliminación del virus.

Durante la infección viral se presenta una disminución en la expresión de proteínas celulares como el MHC-I expresado en membrana de todas las células, esto convierte a las células infectadas en blancos para la actividad de los linfocitos asesinos naturales (NK, por sus siglas en inglés). Estos linfocitos reconocen al MHC-I a través del receptor inhibidor de muerte (KIR, por sus siglas en inglés), y dicha interacción impide la activación de las funciones citotóxicas de dichos linfocitos, por lo que una disminución en la expresión de MHC-I en células infectadas desencadenaría la destrucción de la misma por actividad de los linfocitos NK. Otros participantes son las células de Langerhans, éstas derivan de una población de células dendríticas que se distribuyen a lo largo de la epidermis sobre las capas de los queratinocitos en proliferación. Durante la infección por VPH, las células de Langerhans obtienen los antígenos virales a través de la fagocitosis de partículas virales y residuos de queratinocitos infectados los cuales son procesados por distintas rutas proteolíticas para obtener los epítomos que son presentados a los efectores de la respuesta inmune adaptativa a través del MHC-I y MHC-II (Lehtinen et al. 1993; Orange 2002; Amador-Molina et al. 2013).

### Respuesta inmune humoral contra VPH

La respuesta inmune humoral participa a través de la neutralización de las partículas virales del VPH por anticuerpos IgG específicos a las proteínas estructurales L1 y L2

impidiendo así la entrada del virus en la célula, siendo la proteína L1 la que presenta una mayor inmunogenicidad y la cual, tras haber sido opsonizada con anticuerpos, es fagocitada y destruida por el sistema inmune (M. Stanley 2010). A pesar de que este tipo de respuesta es una barrera rápida y específica ante una reinfección contra VPH, presenta el inconveniente que no puede eliminar aquellos virus que ya han ingresado a la célula, dentro de las cuales el virus entra en un estado latente a través de la inserción del genoma viral en el genoma de la célula convirtiéndola en un reservorio, lo cual eventualmente puede provocar una alteración en su ciclo celular por acción de las oncoproteínas E6 y E7, generando el proceso de malignización celular.

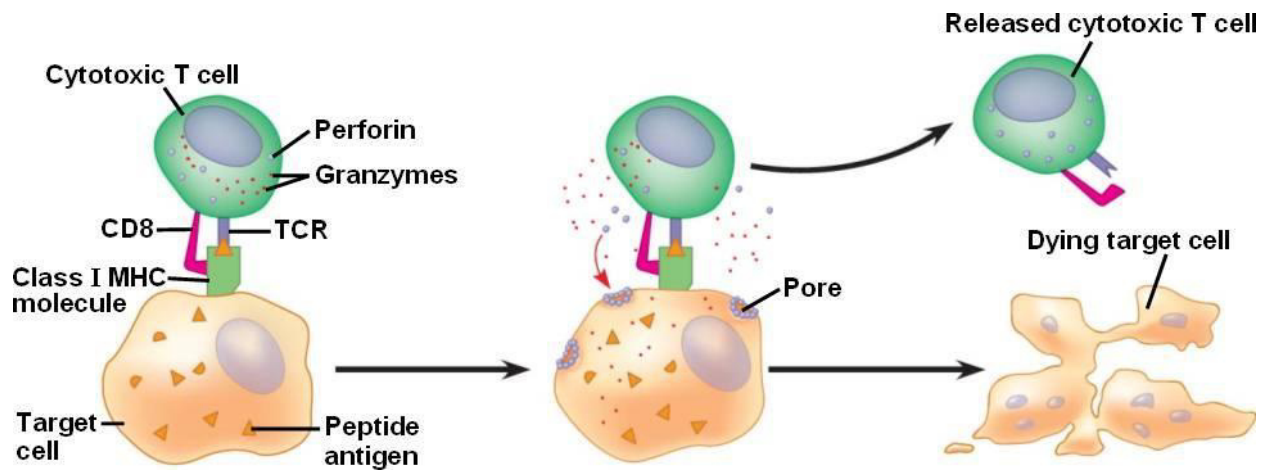
### Respuesta inmune celular contra VPH

La respuesta inmune celular es la principal responsable de la eliminación de las células que han sido infectadas por el virus y que han desarrollado evasión a la respuesta innata de los linfocitos NK. Los principales efectores de la respuesta inmune celular son los linfocitos T citotóxicos (CTLs, por sus siglas en inglés) que expresan en su membrana el marcador CD8+, y los linfocitos T cooperadores (TH, por sus siglas en inglés) que expresan el marcador CD4+. Este tipo de respuesta es eficaz, ya que evita o disminuye la gravedad de una infección así como el tiempo de resolución. Cuando el organismo reconoce por primera vez al antígeno tarda de 4-5 días en montar dicha respuesta, pero una vez creada se genera una memoria inmunológica para evitar futuras reinfecciones.

Los linfocitos T CD8+ son los encargados de reconocer y eliminar las células que han

sido infectadas o comprometidas por el VPH. El proceso inicia con el acoplamiento entre el receptor de los linfocitos T (TCR, por sus siglas en inglés) y la molécula CD8 con el MHC-I de la célula, después se realiza el reconocimiento del epítipo cargado en el MHC-I. En caso de que éste epítipo sea reconocido como extraño o no propio se inicia una producción de IFN- $\gamma$  e IL-2 generando así un estado antivírico y una expansión clonal y reordenamiento en el genoma de los linfocitos T CD8+ para crear TCR específicos al epítipo. Posteriormente, estos linfocitos pasan a circulación sistémica en la búsqueda de células que presenten dicho epítipo, y todas aquellas que lo presenten serán lisadas por acción de las granzimas y perforinas liberadas por los linfocitos T CD8+.

En la infección por VPH, los queratinocitos que se encuentran en etapa de producción de las proteínas tempranas (E1, E2, E4, E5, E6 y E7) son los principales blancos para la respuesta inmune celular debido a ser reservorios celulares ricos en antígenos virales. Por otro lado, los queratinocitos que se encuentran en la etapa de expresión de las proteínas tardías (L1 y L2) generalmente son lisados por el proceso de descamación así como por la salida de partículas virales disminuyendo la oportunidad de su reconocimiento por los linfocitos T CD8+. En el cáncer cervical, las células transformadas se encuentran expresando constitutivamente las oncoproteínas E6 y E7 para el mantenimiento de la malignización, convirtiéndola en un blanco para la respuesta inmune celular. Por lo anterior, el desarrollo de vacunas que generen dicha respuesta inmune se enfocan en el uso de las proteínas E6 y E7 del VPH (Malejczyk, Majewski, and Jabłońska 1997; Cheng et al. 2003; M. Stanley 2010).



**Figura 4. Respuesta citotóxica por linfocitos T CD8+ mediante reconocimiento del MHC-I.** Se muestra la actividad citotóxica de linfocitos T CD8+ activada por la presentación de epítomos extraños en MHC-I.

Por otro lado, los linfocitos T CD4+ son aquellos encargados en la producción de citocinas que cooperan o regulan la respuesta inmune generada. En base a la naturaleza de las citocinas producidas se dividen en linfocitos Th1 y Th2; los primeros producen citocinas proinflamatorias para la activación de la respuesta inmune celular, mientras que los segundos producen citocinas antiinflamatorias que regulan o inhiben la respuesta inmune celular. Durante una infección de VPH, la principal función de linfocitos T CD4+ es la producción de citocinas proinflamatorias (Th1) para apoyar en la activación y funciones citotóxicas de los linfocitos T CD8+ para la eliminación de las células infectadas o malignizadas. Debido a esto, en el diseño de vacunas contra el cáncer cervical por VPH se busca que éstas sean capaces de generar una respuesta inmune Th1 que prevalezca sobre la respuesta Th2 que se genere (Pardoll and Topalian 1998; Steele et al. 2002).



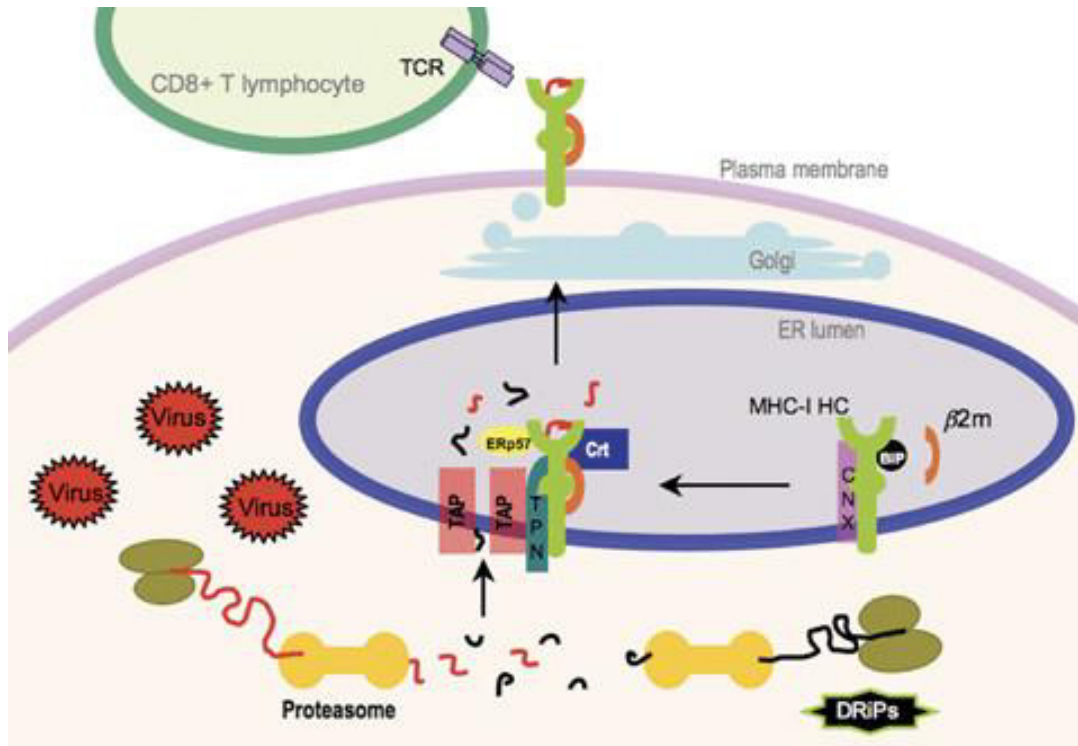
Por consiguiente, una respuesta inmune ideal contra VPH sería aquella que genere una inmunidad humoral que produzca anticuerpos capaces de neutralizar las partículas virales para prevenir su entrada a las células, y una inmunidad celular que sea capaz de generar células citotóxicas que reconozcan y destruyan aquellas células infectadas o transformadas, así como células cooperadoras que favorezcan la función de las células citotóxicas.

### Presentación de antígenos por el Complejo Mayor de Histocompatibilidad

El complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, por sus siglas en inglés) es un componente esencial en la generación de una respuesta inmune específica, donde su función reside en presentar pequeños péptidos a los linfocitos, proceso que se conoce como *presentación de antígenos*. Estos péptidos son conocidos como epítomos y son productos de la degradación enzimática de proteínas extrañas (de los microorganismos que hayan ingresado en la célula o proteínas aberrantes producto de la transformación celular), así como de proteínas propias de la célula que han sido degradadas por el mantenimiento, reordenamiento y reciclaje de componentes celulares. Debido a que el MHC presentan tanto epítomos propios como no propios, son los linfocitos los responsables en discernir cuando debe despertarse una respuesta inmune o cuando no.

El MCH se divide en dos tipos: I y II, donde ambos coinciden en la función de presentación de antígenos, aunque su expresión está restringida a diferentes células que a continuación se mencionará (Neefjes et al. 2011). El MHC-I se encuentra constituido por

dos subunidades, una cadena  $\alpha$  con 3 dominios ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ) y la subunidad  $\beta 2$ -microglobulina. Dentro del dominio  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  se acopla un epítipo de 8 a 9 aminoácidos que será presentado, mientras que el dominio  $\alpha 3$  corresponde a la fracción transmembranal que ancla la cadena  $\alpha$  en la membrana celular. Esta molécula se sintetiza en el retículo endoplásmico, la cual durante su plegamiento requiere la adición del epítipo para que sea estabilizada y enviada hacia la superficie celular. Los epítipos presentados por MHC-I son productos de la degradación de proteínas por el proteosoma incluyendo aquellos derivados de la degradación asociada a retículo endoplásmico, y de los productos ribosomales defectuosos (ERAD y DRiPs, respectivamente). Éstos péptidos generados entran al retículo endoplásmico a través del sistema de transportadores asociados al procesamiento de antígenos (Tap-1 y Tap-2, por sus siglas en inglés) para posteriormente ser cargados al MHC-I con la ayuda de proteínas chaperonas, como la calreticulina. El MHC-I se presenta en todas las células nucleadas del organismo y es reconocido por el TCR de los linfocitos T CD8+, por lo que todas las células (con excepción de los eritrocitos) se encuentran bajo un proceso denominado *vigilancia inmunológica* por los linfocitos, y en caso de detectarse epítipos no propios se genera una respuesta inmune celular que culmina con la destrucción de la célula afectada (Malejczyk, Majewski, and Jabłońska 1997; Neefjes et al. 2011).



**Figura 5. Cargado de epítomos al MHC-I.** Se muestra como los pequeños péptidos derivados de diversas vías de degradación entran a retículo endoplásmico para ser cargados al MHC-I.

El MHC-II se constituye de dos cadenas,  $\alpha$  y  $\beta$ , donde cada una contiene 2 dominios,  $\alpha 1$ - $\alpha 2$  y  $\beta 1$ - $\beta 2$ , respectivamente. Los dominios  $\alpha 2$  y  $\beta 2$  son las fracciones transmembranales que anclan las cadenas a la membrana celular, mientras que en la región central entre  $\alpha 1$  y  $\beta 1$  corresponde a la zona donde se carga el epítomo de 9-12 aminoácidos. Este complejo es expresado solamente en las células presentadoras de antígeno (CPAs), principalmente células dendríticas y macrófagos, cuya función primordial es la fagocitosis e hidrólisis de cuerpos extraños, residuos celulares, proteínas intersticiales, etc. También se expresa en los linfocitos B, pero estos presentan una actividad fagocítica menor (Roche and Furuta 2015). Esta molécula también es sintetizada en el retículo endoplásmico; sin embargo, durante su síntesis se coloca un péptido denominado cadena invariante (CIIP) entre  $\alpha 1$  y

$\beta 1$  para estabilizar el MHC-II y promover su salida del retículo endoplásmico y posteriormente ubicarla en la cara interna de las membranas del endosoma. Después, el endosoma se fusiona con fagosomas hidrolizando todo su contenido y los pequeños péptidos generados por la hidrólisis sustituyen las cadenas CLIP de los MHC-II para posteriormente ser enviados a la superficie celular. Finalmente, el MHC-II es reconocido por el TCR los linfocitos T CD4+ los cuales liberan citocinas para cooperar o inhibir una respuesta inmune, donde dicha respuesta depende del epítipo y del microambiente extracelular generado por las señales de las células vecinas. Por lo tanto, los péptidos presentados por el MHC-II generalmente son obtenidos del espacio extracelular, a diferencia del MHC-I que son derivados de proteínas intracelulares. Sin embargo, se ha descrito que antígenos extracelulares pueden ser presentados por MHC-I a través de un proceso conocido como *presentación cruzada de antígeno*, induciendo así una activación de una respuesta inmune celular cooperadora y citotóxica (Neefjes et al. 2011; Roche and Furuta 2015).

### Mecanismos de evasión a la presentación de antígenos por el VPH

A pesar de los múltiples mecanismos de defensa descritos, la infección por VPH puede persistir en el organismo y degenerar en un proceso de malignización celular a través de diversos factores, tales como un estado inmunocomprometido, reinfecciones frecuentes, tipo viral e integración genómica del VPH (Duensing et al. 2000). Dentro de la evasión a la respuesta inmune innata se ha reportado que en pacientes que presentan recurrentes infecciones por VPH presentan una disminución del número y actividad de los

linfocitos NK (Malejczyk et al. 1989). En un estudio *in vitro* se determinó que la proteína E5 es capaz de disminuir la expresión de C1d, una molécula relacionada a la familia de MHC-I con capacidad de presentar antígenos lipídicos extracelulares que activan a células NK y linfocitos, inhibiendo así la activación del sistema inmune (Miura et al. 2010).

Otra característica del VPH que permite la evasión a la respuesta inmune es la infección lisogénica, ya que el genoma viral integrado en los queratinocitos se mantiene expresando en bajas cantidades las proteínas tempranas (siempre y cuando no se presente una disrupción del gen regulador E2) y solamente entra en vía lítica al expresar las proteínas tardías en las últimas capas del epitelio cervical, lo cual generalmente ocurre hasta 3 semanas después de la infección inicial. Esto permite que la captura de partículas virales y presentación de antígenos sea mínima en etapas tempranas de la infección favoreciendo así el escape a la respuesta inmune (M. A. Stanley 2012).

Aunado a lo anterior, se ha detectado que aquellas células que han sido infectadas, y principalmente aquellas que han sido malignizadas por VPH, presentan una reducción en la expresión de MHC-I, sub-unidades LMP-2 y 7 del proteosoma, y las proteínas transportadoras de antígenos Tap-1 Y Tap-2 (Kanodia, Fahey, and Kast 2007). En células sanas se ha reportado que de cada 1000 proteínas degradadas solamente un péptido es presentado por el MHC-I (Yewdell 2001), por lo que la reducción de la expresión de moléculas involucradas en la degradación y presentación de antígenos por la infección con VPH supondría una mayor dificultad para despertar una respuesta inmune específica contra el virus. Debido a lo anterior, una estrategia para generar una efectiva respuesta inmune

contra las células infectadas por el VPH es buscar eliminar estos obstáculos mediante el aumento de la presentación de antígenos y la generación de una mayor sensibilización específica al antígeno para reconocer células afectadas por la subexpresión del MHC-I y las señales coestimuladoras.

### Vacunas en la actualidad contra VPH y cáncer cervical

En la actualidad se comercializan las vacunas Gardasil y Cervarix, las cuales ya han sido distribuidas principalmente en la población femenina menor de 12 años. Estas vacunas están enfocadas en la generación de anticuerpos neutralizantes contra la proteína tardía L1 siendo capaces de opsonizar las partículas virales y de prevenir su entrada en la célula. Estas vacunas fueron desarrolladas en base al VPH-16 y VPH-18 por ser de alto riesgo oncogénico, y han demostrado poseer niveles altos de protección contra las partículas virales. Sin embargo, estas vacunas son profilácticas ya que solo previenen la entrada del virus en la célula, por lo que son funcionales principalmente en la población joven que no ha estado en contacto con el VPH. Aun así, dichas vacunas han demostrado efectos promisorios al disminuir los niveles de infección por VPH y se espera que esto se traduzca en el futuro en una reducción en el número de casos de cáncer cervical de la futura población adulta (M. Stanley 2010).

La vacuna Gardasil (Merck & Co., Inc) es una vacuna tetravalente dirigida contra los tipos de VPH 6, 11, 16 y 18, mientras que Gardasil 9 es nonavalente, ya que protege contra los tipos mencionados anteriormente así como los tipos de 31, 33, 45, 52 y 58. Por otro

lado, la vacuna Cervarix es bivalente ya que está dirigida contra los tipos 16 y 18 por ser los virus de mayor potencial oncogénico. Estas vacunas se basan en el uso de partículas similares a virus (VLP, por sus siglas en inglés) formuladas en base a la proteína tardía L1, y su administración es vía intramuscular con 3 dosis distribuidas en 6 meses (Schiller, Castellsagué, and Garland 2012; Draper et al. 2013).

Actualmente no hay vacunas que controlen los reservorios virales durante una infección activa con VPH, así como para el cáncer cervical originado a raíz de la transformación celular por la integración y desregulación del genoma viral. Entre los principales objetivos en el desarrollo de vacunas terapéuticas es que sean capaces de generar una respuesta inmune citotóxica capaz de eliminar las células infectadas y malignizadas y que además, tras la resolución, sean capaces de generar una respuesta inmune de memoria eficaz. También se espera que dicha respuesta inmune sea controlada, esto quiere decir que solo sea reactiva para VPH con un daño mínimo a células no infectadas/malignizadas, y que una vez que haya sido eliminada la infección vuelva al estado de memoria inmune latente.

#### Vacunas con versiones no oncogénicas de E6 y E7

Dentro de los antígenos de mayor importancia terapéutica destacan las proteínas E6 y E7 del VPH por su potencial oncogénico y su rol en el inicio y mantenimiento de la malignidad celular; además que éstas al expresarse constitutivamente en las células infectadas y en las malignizadas han sido catalogadas como antígenos asociados a tumor

(AAT) (Shillitoe 2006). En base a lo anterior, Wu y colaboradores desarrollaron la línea tumoral TC-1, la cual deriva de células epiteliales de pulmón de murinos de la cepa C57BL/6 transformadas con los genes E6 y E7 del VPH-16 y con el oncogen ras (Lin et al. 1996). Este modelo de cáncer *in vivo* ha sido ampliamente utilizado para evaluar vacunas y quimioterapias contra tumores generados por VPH (Cheng et al. 2001; Kim et al. 2004; Amine et al. 2009; Loera-Arias et al. 2010; Chen et al. 2014).

El utilizar antígenos completos representa la ventaja de eliminar la restricción de epítomos para los distintos polimorfismos de MHC presentes en la población; sin embargo, el uso de las formas completas y nativas de E6 y E7 representa un riesgo latente oncogénico (Ms and R 1989; Wazer et al. 1995). Aunado a esto, se ha reportado que E6 y E7 presentan una inmunogenicidad baja siendo necesario el uso de adyuvantes, tales como el adyuvante de Freund (Li et al. 2010), siendo una estrategia no viable para su uso en humanos. Por todo lo anterior, se ha realizado el desarrollo de variantes no oncogénicas de E6 y E7 para eliminar dichas desventajas (Chen et al. 2014); además, se ha buscado el diseño de vacunas y estrategias de inmunización que mejoren la respuesta obtenida y puedan ser aplicadas en la población (Yang et al. 2016).

Una estrategia para lograrlo es insertar mutaciones puntuales en los sitios activos de unión a zinc con la finalidad de irrumpir la actividad oncogénica de E6 y E7. En base a esto, se evaluó el efecto de las mutaciones de las cisteínas 66 y/o 136 por glicinas en E6 registrándose una incapacidad de transformar la línea COS-1, y además se detectó que la versión mutante tenía una menor presencia en núcleo y en el número de células en



comparación a la versión nativa, indicando que dicha proteína era más inestable y susceptible a degradación (Kanda et al. 1991). Así mismo, en otro reporte se menciona la importancia de las cisteínas 66 y 106 (y en segundo término el triptófano 132) al ser esenciales para inducir la degradación de p53 por el proteosoma (Dalal et al. 1996).

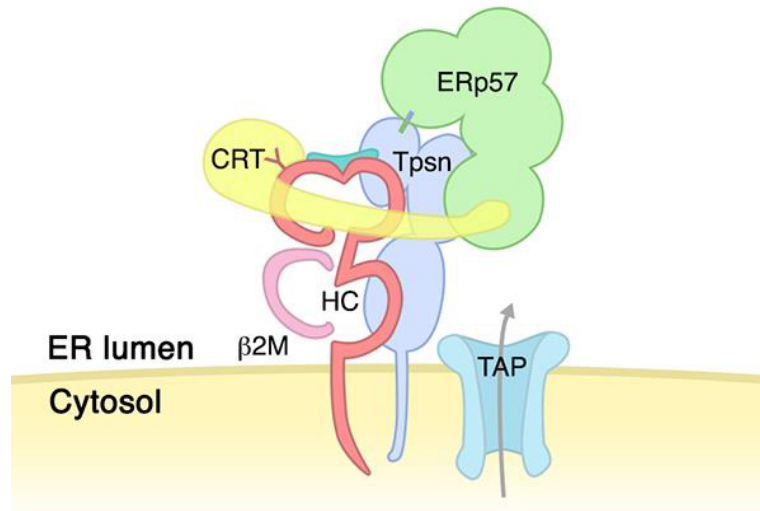
Esta técnica de eliminación de sitios activos a través de mutaciones puntuales también fue evaluada para E7, consistiendo en la sustitución de las cisteínas 58 y 91 por glicinas, también era capaz de eliminar el potencial oncogénico, y que además al inmunizar con E7 mutante se obtenía una mejor respuesta inmune celular detectando un aumento significativo de linfocitos T CD8+ específicos en comparación al uso de la E7 nativa. Lo anterior se le atribuyó a que la E7 mutante, al ser más inestable, era más fácilmente degradada y por consiguiente había un aumento de epítopos disponibles para ser cargados al MHC-I (W. Shi et al. 1999). Sin embargo, cabe recordar que E7 aún puede unirse a pRB ya que sus sitios de unión no han sido mutados (aminoácidos del 21-24); sin embargo, el efecto oncogénico solo se presenta tras la disrupción de pRb/E2F por acción del dedo de zinc en forma nativa, por lo que eliminando dichos aminoácidos supondría una proteína E7 mutante más segura (Münger et al. 2004).

En base a lo anterior se han desarrollado estrategias involucrando el uso de versiones mutantes de E6 y E7 (Loera-Arias et al. 2010; Wieking et al. 2012; Chen et al. 2014). Para el presente trabajo nos enfocamos en la sustitución de las cisteínas por glicinas de los aminoácidos 63 y 106 para E6; así como el 58 y 61 para E7, donde además a esta última se le realizó una delección de los aminoácidos 21 al 24.

## Fusión de antígenos a Calreticulina para potenciar la respuesta inmune

Una estrategia para aumentar la inmunogenicidad de antígenos asociados a tumor ha sido la fusión de estos a proteínas que los dirijan a diferentes organelos. Esto fue demostrado por Wu y colaboradores, donde la fusión de E7 a proteínas chaperonas de retículo endoplásmico promovía la expresión de E7 en este organelo. Dentro las proteínas chaperonas evaluadas, fue la calreticulina de conejo la que presentó un mayor efecto antitumoral, y ha sido ampliamente estudiada en fusión con los antígenos E6 y E7 del VPH (Cheng et al. 2001; Kim et al. 2004; Peng et al. 2005; Chen et al. 2014).

La calreticulina (CRT) es una proteína chaperona que reside dentro del retículo endoplásmico, la cual está íntimamente relacionada al complejo de carga de antígenos al MHC-I (PLC, por sus siglas en inglés), siendo copartícipe con las proteínas TAP 1 y TAP2, la tapasina, ERp57 y calnexina. Entre otras de las funciones de la calreticulina está el regular el nivel citosólico de  $\text{Ca}^{+2}$  y el ser una señal en células pro-apoptóticas para que sean fagocitadas y eliminadas del organismo generando el concepto denominado como *muerte inmunogénica*. Debido a que la mayoría de sus funciones se desarrollan dentro el retículo endoplásmico, la calreticulina presenta una secuencia de péptido señal (SP) en su extremo amino terminal que la envía a dicho orgánulo, mientras que en el extremo carboxilo terminal presenta una señal de 4 aminoácidos (KDEL) que la retiene en el retículo endoplásmico (Sönnichsen et al. 1994; Gelebart, Opas, and Michalak 2005).



**Figura 6. Chaperonas del complejo de carga de antígenos para MHC-I.** En la imagen se muestran las principales chaperonas participantes en la carga de epítomos en el MHC-I, dentro de los cuales se encuentra la calreticulina (Imagen tomada de Jean-Simon Fortin).

Hay diversas hipótesis relacionadas con el mecanismo de acción que está participando en la mejora de la respuesta inmune observada al fusionar antígenos a calreticulina, uno de estos es la función propia de la calreticulina y su participación en la carga de epítomos en MHC-I, ya que pudiese estar mejorando el procesamiento de los mismos; además, cabe recordar que la expresión del antígeno se lleva a cabo dentro del retículo endoplásmico generando posiblemente una mayor disponibilidad para presentación del antígeno por MHC-I (Cheng et al. 2001).

En los últimos años la sobreexpresión de calreticulina ha sido asociada con ciertos tipos de cáncer metastásicos, esto debido a las funciones en regulación de  $\text{Ca}^{+2}$  citosólico y su participación indirecta en la motilidad celular (Zamanian et al. 2013; F. Shi et al. 2014; Zamanian et al. 2016). Mientras que en otros reportes describen casos de autoinmunidad

contra la calreticulina por posibles sobre-reacción del sistema inmune (Eggleton and Llewellyn 1999; Sontheimer et al. 2003; Holoshitz, De Almeida, and Ling 2010). Por lo anterior, es necesario el desarrollo de estrategias más seguras que no impliquen la sobre-expresión de proteínas exógenas.

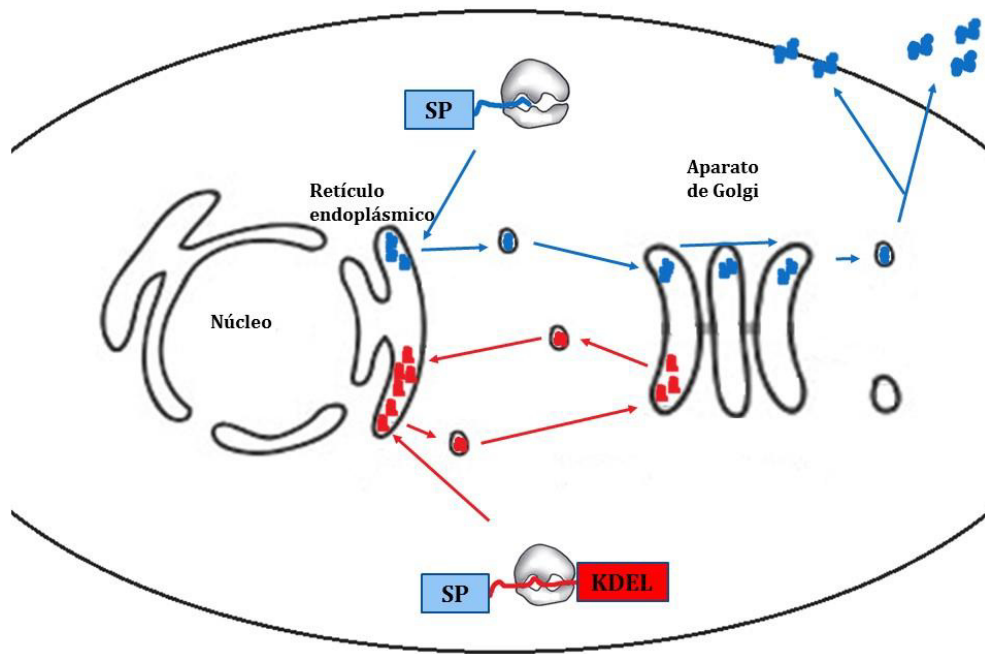
### Sistema adyuvante basado en el envío de antígenos a retículo endoplásmico

Nuestro grupo de trabajo también ha empleado la fusión de E7 con calreticulina, la cual fue evaluada bajo un sistema de inmunización con adenovirus obteniendo como resultado una mejora de la respuesta antitumoral (Gomez-Gutierrez et al. 2007). Sin embargo, con la finalidad de eliminar el uso de la calreticulina, se decidió analizar si la fusión del antígeno E7 a las señales de envío y retención de la calreticulina humana podría conferir una protección antitumoral. Para lo anterior, se realizó una construcción adenoviral del antígeno E7 con la señal SP en su extremo amino terminal y señal KDEL en su extremo carboxilo terminal, la cual al ser analizada por inmunofluorescencia se detectó que E7 se localizaba en retículo endoplásmico, y que la inmunización con dicha construcción era capaz de conferir un efecto antitumoral profiláctico equivalente al obtenido por CRT-E7 (Loera-Arias et al. 2010). Con estos resultados se demostró que el envío y retención de antígenos en retículo endoplásmico mediante el uso de las señales SP y KDEL es capaz de generar una respuesta antitumoral.

Se ha reportado que el envío de epítomos inmunogénicos al retículo endoplásmico mediante la fusión a un péptido señal es capaz de generar un aumento en la presentación

de dicho epítipo (Anderson et al. 1991; Leifert et al. 2004; Kovjazin and Carmon 2014). Así también, un reporte indicó que el uso de KDEL en antígenos exógenos aumentaba su cargado en el MHC-I (Wang et al. 2004). Sin embargo, muchas de estas estrategias están basadas en fusión de epítopos cortos restringidos a ciertos MHC poblacionales.

Debido a los múltiples reportes que validan el uso de señales de SP para la mejora de la respuesta antitumoral, en el presente trabajo decidimos analizar el impacto del uso de la señal KDEL en la estrategia planteada por nuestro equipo de trabajo. En las estrategias que utilizan solamente SP, el antígeno es enviado a retículo endoplásmico, sin embargo, éste es ingresado a la vía secretora y por ende hay una subsecuente salida hacia el espacio extracelular. Debido a que la señal KDEL promueve la retención de las proteínas en retículo endoplásmico, nuestra estrategia se basa en la premisa que dicha retención es necesaria para aumentar la estadía del antígeno en el retículo endoplásmico y de esta manera aumentar probabilidad de procesamiento del antígeno para la vía de MHC-I (Figura 7).



**Figura 7. Diagrama de flujo de proteína con señal SP o SP-KDEL.** En la imagen se plantea la posible ruta de una proteína al presentar SP en extremo amino o al presentar SP y KDEL en el extremo amino terminal y carboxilo terminal, respectivamente.

### Inmunización con ADN por biobalística

La inmunización con ADN consiste en la inyección directa intramuscular o subcutánea con plásmidos codificantes para el antígeno de interés, los cuales tras ingresar a las células expresan el gen clonado. Ésta expresión origina proteínas intracelulares generando una mayor proporción de presentación del antígeno por MHC-I y por ende la inducción de una respuesta inmune celular. Sin embargo, también se puede presentar por MHC-II debido a la fagocitosis de remanentes celulares con el antígeno, o inclusive el antígeno presente en líquido extracelular derivado por la secreción activa de células transfectadas. En ensayos se ha validado que las vacunas de ADN son capaces de generar

niveles de protección altos mediante la estimulación de anticuerpos así como componentes de la inmunidad celular (Garmory, Brown, and Titball 2003; Ferraro et al. 2011).

Los plásmidos utilizados como vacunas de ADN presentan un promotor para la expresión de proteínas en eucariotas, siendo el promotor CMV (derivado del citomegalovirus) el más utilizado por inducir una alta tasa de transcripción del gen clonado, suponiendo así una concentración alta del antígeno y por consiguiente un aumento de probabilidad de activación del sistema inmune. Otro elemento que presentan algunos plásmidos son las señales imunoestimuladoras (ISS), las cuales consisten en secuencias no metiladas de CpG bacteriano flanqueado por dos purinas en 5' y dos pirimidinas en 3', donde la secuencia más conocida y de mayor inmunogenecidad se presenta en el gen de resistencia para ampicilina. Estas señales son catalogadas como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, por sus siglas en inglés) las cuales al ser reconocidas por los receptores Toll-like 9 (TLR9) presentes células dendríticas, monocitos y células NK, estimulan la producción de citocinas proinflamatorias (Sato et al. 1996; Azevedo et al. 1999; Garmory, Brown, and Titball 2003). Las principales ventajas que ofrece el uso de vacunas de ADN son la rapidez con la que se pueden generar las construcciones a ser evaluadas en ensayos pre-clínicos, la facilidad de escalamiento, purificación y el almacenaje libre de cadenas de frío a nivel de industria (Ghanem, Healey, and Adly 2013).

Dentro de los métodos para la aplicación de las vacunas de ADN destaca el uso del sistema de biobalística impulsado a altas presiones, las cuales inician su expresión tras 3 horas de haber sido transfectadas, manteniéndose de 28 hasta 59 días después (Ibraheem,

Elaissari, and Fessi 2014). Éste método presenta la ventaja de requerir un bajo número de inmunizaciones y una baja cantidad de ADN para la obtención de una respuesta inmune favorable (Ferraro et al. 2011). Sin embargo, la principal ventaja es que es capaz de transfectar la epidermis de la piel, en la cual hay una alta presencia de células dendríticas que son capaces de presentar eficazmente el antígeno tanto por MHC-I como por MHC-II, generando así una fuerte respuesta inmune celular específica a antígeno (Garmory, Brown, and Titball 2003; Neefjes et al. 2011). Se han desarrollado trabajos que utilizan este sistema de inmunización demostrando resultados favorables al obtener una mayor sensibilización al antígeno por parte de las linfocitos T CD8+ traduciendo en un mayor efecto antitumoral *in vivo* (Cheng et al. 2001; Kim et al. 2004; Peng et al. 2005). Por lo anterior, en el presente trabajo se optó por utilizar este sistema para la administración de las construcciones de ADN para su evaluación como potenciales vacunas.



## **HIPÓTESIS**

---

La adición de la señal de retención en retículo endoplásmico (KDEL) al antígeno E6E7m fusionado a un péptido señal es necesaria para la mejora de la respuesta inmune antitumoral.

## **OBJETIVO GENERAL**

---

Determinar la importancia de la señal KDEL en el efecto antitumoral del antígeno E6E7m enviado a retículo endoplásmico.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

---

1. Demostrar si el sistema de envío y retención de antígenos en retículo endoplásmico funciona como vacuna de ADN.
2. Realizar las construcciones génicas del antígeno E6E7m fusionado a la señal de envío y/o retención al retículo endoplásmico.
3. Demostrar la expresión y localización del antígeno E6E7m fusionado a la señal de envío y/o retención al retículo endoplásmico.
4. Comparar el efecto antitumoral in vivo entre las vacunas de ADN del antígeno E6E7m fusionado a la señal de envío y/o retención al retículo endoplásmico.

## MATERIALES

---

### Plásmidos

- pShuttle-CMV. Plásmido de 7.5 kb, que presenta un promotor CMV para expresión constitutiva en células eucariotas. Contiene el gen para resistencia a Kanamicina para la selección de colonias recombinantes.
- pUMVC4a. Plásmido de 4.5 kb, que presenta un promotor CMV para expresión constitutiva en células eucariotas, así como Intron A truncado para mayor eficiencia de la expresión. Presenta una secuencia inmunoestimuladora (ISS) del gen de resistencia a ampicilina (-), y contiene el gen para resistencia a Kanamicina para la selección de colonias recombinantes.
- pcDNA 4/TO/LacZ (Thermo Fisher Scientific).- Plásmido de 8.1 kb, presenta un promotor CMV para la expresión constitutiva de la enzima  $\beta$ -galactosidasa. Contiene el gen para resistencia a Ampicilina para la selección de colonias recombinantes.

### Péptidos

- Epítipo E6: YDFAFRDL; aminoácidos 50-57, (GenWay Biotech, Inc.)
- Epítipo E7: RAHYNIVTF; aminoácidos 49-57, (GenWay Biotech, Inc.)

## Animales

- Cepa murina C57BL/6. Se utilizaron hembras de 6-8 semanas de edad y fueron mantenidas en ciclos de 12 horas luz/oscuridad bajo libre acceso a comida y agua. Fueron adquiridos de Harlan y Círculo de ADN SA de CV (Cd. de México). El manejo de los murinos fue acorde a lo descrito por la Norma Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Los ensayos in vivo fueron evaluados y aprobados por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León bajo el siguiente número de registro: HT14-002.

## Líneas celulares

- HEK-293: Línea inmortalizada derivada de células embrionarias de riñón gracias a la expresión del gen E1 del Adenovirus 5 integrado en su cromosoma 19 (CRL-1573, ATCC).
- TC-1: Línea tumoral derivada de cáncer pulmonar de cepa murina C57BL/6 gracias a la expresión de las oncoproteínas E6 y E7 del HPV-16. (CRL-2785 discontinuada, ATCC).

## Bacterias

- Escherichia coli DH5  $\alpha$ : Cepa bacteriana para replicación de ADN plásmido (18265017, Thermo Fisher Scientific)

## Cultivo Celular

- Medio DMEM “Dulbecco's Modified Eagle Medium” (11960-085, Thermo Fisher Scientific)
- Medio RPMI 1640 “Roswell Park Memorial Institute” (31870-082, Thermo Fisher Scientific)
- FBS: Suero Fetal Bovino (10082147, Thermo Fisher Scientific)
- Glutamina: GlutaMAX (35050-061, Gibco)
- Piruvato (11360070, Gibco)
- Antibiotico-Antimicótico: Penicilina-Streptomicina (11360070, Gibco)
- G-418: Geneticina (11811023, Thermo Fisher Scientific)
- Mercaptoetanol (21985023, Gibco)
- IL-2 murina ( 14-8021-64, Ebioscience)
- PHA: Fitohemaglutinina (00-4977, Ebioscience)
- Ficoll-Paque (GE17-1440-02, Sigma-Aldrich)
- Azul de tripan (15250061, Gibco)
- Tripsina (25200056, Gibco)
- PBS 1X: 137 mM NaCl; 2.7 mM KCl; 4.3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1.47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. pH 7.2-7.4.
- DMSO: Dimetilsulfóxido (276855, Sigma-Aldrich)
- Suero de caballo (16050130, Gibco)
- Ketamina: Anesket (1015154, PiSA Agropecuaria)
- Xilacina: Procin (1016040, PiSA Agropecuaria)

## Cultivo Bacteriano

- Medio LB Broth Miller: (C14041701, USBiological)
- Agar LB para bacterias: Medio LB + 1.5 % Agar (A-1296, Sigma-Aldrich)
- Medio SOC: Medio LB + 20 mM Glucosa (G8270, Sigma-Aldrich)
- Ampicilina (A2260, USBiological)
- Kanamicina (K0010, USBiological)
- H<sub>2</sub>O MQ

## Kits

- Oligonucleótidos M13 (Thermo Fisher Scientific)
- Marcador de Peso Molecular 1 kb plus (Thermo Fisher Scientific)
- Gene Clean Gel Extraction Kit (GenScript)
- Plasmid Midi Prep kit (Qiagen)
- Turbofect (Thermo Fisher Scientific)
- Pierce BCA Protein Assay (Thermo Fisher Scientific)
- 30% Acrilamida/Bis-Acrilamida (Bio-Rad)
- Supersignal West Pico (Thermo Fisher Scientific)
- Solución Reveladora/Fijadora (Kodak)
- Film Fotográfico (Kodak)
- Restore Western Blot Stripping Buffer (Thermo Fisher Scientific)

- Vecta Shield con DAPI (Vector Laboratories)
- Partículas de oro 1 µm (Bio-Rad)
- Espermidina (Sigma-Aldrich)
- Mouse IFN-gamma Platinum ELISA (Ebioscience)
- Mouse IFN-gamma/Granzyme B Dual-Color ELISpot Kit (R&D Systems)
- CytoFix/CytoPerm (Ebioscience)

## Enzimas

- Go Taq DNA Polymerase (M3001, Promega)
- Shrimp Alkaline phosphatase (M037S01, NEB)
- T4 DNA ligase (M1801, Promega)
- Endonucleasa *NheI* (R3131, NEB)
- Endonucleasa *SalI* (R3138, NEB)
- Endonucleasa *BamHI* (R3136, NEB)
- Endonucleasa *ApaI* (R0114, NEB)
- Endonucleasa *KpnI* (R3142, NEB)
- Endonucleasa *BglII* (R0144, NEB)
- Endonucleasa *SmaI* (R0141, NEB)
- Endonucleasa *XbaI* (R0145, NEB)

## Anticuerpos

- Anticuerpo monoclonal de murino Anti-E6 (sc-460, C1P5, Santa Cruz Biotechnology)
- Anticuerpo monoclonal de murino Anti-E7 (sc-65711, NM2, Santa Cruz Biotechnology)
- Anticuerpo monoclonal de murino Anti- $\beta$ -actina (A5441, Sigma-Aldrich)
- Anticuerpo policlonal de conejo Anti-IgG Murina conjugado con HRP (A9044, Sigma-Aldrich)
- Anticuerpo policlonal de conejo Anti-Calnexina (sc-1397, Santa Cruz Biotechnology, Inc.)
- Anticuerpo policlonal de cabra Anti-IgG murina conjugado con Alexa 594 (A-11005, Invitrogen)
- Anticuerpo policlonal de cabra Anti-IgG conejo conjugado con Alexa 488 (A-11034, Invitrogen)

## Reactivos

- Buffer de Carga para ADN "Gel-Red" (Biotium)
- Isopropanol (Sigma-Adrich)
- Etanol (CTR)
- TEMED (Sigma-Aldrich)
- Tween 20 (Sigma-Aldrich)
- Parafina (CTR)



- Hematoxilina (Sigma-Adrich)
- Eosina (Sigma-Adrich)
- Acetona (CTR)

## Soluciones

- Agarosa (Sigma-Aldrich) Preparar en TAE 1X.
- Buffer TAE 1X: 40mM Tris, 20mM ácido acético y 1mM EDTA.
- $\text{CaCl}_2$  0.075M/15 % de glicerol
- Solución I Miniprep: 50 mM glucosa, 5 mM Tris-Cl (pH 8.0), 10 mM EDTA (pH 8.0).
- Solución II Miniprep: 0.2N NaOH, 1% SDS.
- Solución III Miniprep: 3M acetato de potasio, 2M ácido acético.
- Buffer RIPA: 25 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 0.5% deoxilato sódico, 1% Tritón.
- Tris-HCl pH 6.8, 0.5M (Sigma-Aldrich)
- Tris-HCl pH 8.8, 1.5 M (Sigma-Aldrich)
- SDS (Sigma-Aldrich) Preparar al 10% en  $\text{H}_2\text{O}$  MQ.
- PSA (Sigma-Aldrich) Preparar al 10% en  $\text{H}_2\text{O}$  MQ y congelar.
- Buffer Tris-Glicina 1X: 25 mM Tris, 192 mM glicina, 0.1% SDS, pH 8.3
- Buffer de carga para proteínas 4X: 40% glicerol, 240 mM Tris pH 6.8, 8% SDS, 5% mercaptoetanol, 0.05% azul de bromofenol.
- Buffer de transferencia: 25mM Tris, 190mM Glicina, 20 % Metanol.
- TBS 1X: 50 mM Tris-Cl, pH 7.5. 150 mM NaCl.

- TBS-Tween: TBS1X + 0.05% Tween
- Leche descremada (Svelty) Preparar en TBS1X
- Etanol Absoluto para Biología Molecular (Sigma-Aldrich)
- PVP (Bio-Rad) Preparado en Etanol Grado Biología Molecular
- Buffer ACK: 150 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 10 mM  $\text{KHCO}_3$  y 0.1 mM EDTA
- Buffer FACS: 1% BSA y 0.1% azida de sodio en PBS1X-
- Paraformaldehído (PFA) (Sigma-Aldrich) Preparar en PBS1X
- Tinción X-Gal: 5mM Ferrocianuro de potasio, 5 mM Ferrocianato de potasio, 2mM Cloruro de Magnesio, PBS 1X, 0.1% X-Gal,

#### Equipo de laboratorio

- Balanza Analítica (GR-120, AND)
- Campana de Flujo Laminar Clase II (AH-100, TelStar)
- Incubadora para cultivo celular (370, Thermo Electron Corporation)
- Microscopio invertido (9804439, Southern Precision Instrument)
- Baño de perlas para cultivo celular (74300714, Lab Armor)
- Micropipetas 1000  $\mu\text{l}$ , 200  $\mu\text{l}$ , 100  $\mu\text{l}$ , 20  $\mu\text{l}$  y 10  $\mu\text{l}$  (Labnet)
- Cámara de Neubauer (Propper)
- Termociclador (PTC-100, MJ Research, Inc)
- Fuente de poder (300 Plus, Labnet)
- Cámara de electroforesis de geles de agarosa (B1A, Owl Separation Systems, Inc.)

- Transiluminador UV (2000, Bio-Rad)
- Espectrofotómetro (BioPhotometer, Eppendorf)
- Refrigerador 4/-20°C (Samsung)
- Ultracongelador -80°C (Revco Value Plus, Thermo Fisher Scientific)
- Centrifuga para tubos tipo Eppendorf (A1-15K, Sigma)
- Centrifuga para tubos tipo Falcon (Sorval STR 16R, Thermo Scientific)
- Incubadora para bacterias (TU-400, MRC)
- Incubadora refrigerada (LM-570, MRC)
- Vortex (VX-100, Labnet)
- Sonicador (Transsonic 420, Lab-line Elma)
- Lector de placas de ELISA (iMARK, Bio-Rad)
- Cámara de electroforesis para geles de acrilamida (Mini Protean, Bio-Rad)
- Cámara de transferencia (TransBlot Semi-Dry, Bio-Rad)
- Microscopio confocal con fluorescencia (LSM 710, Carl Zeiss).
- Estación para biobalística (Bio-Rad) acoplada a gas de óxido nitroso (Praxair)
- Biobalística por Gene-gun (Bio-Rad) acoplada a gas Helio (Praxair)
- Citómetro Accuri C6 (BD Biosciences)
- Histoquinete (Kedee)
- Estereomacroscopio (L2, Leica)
- Software para conteo manual de células (Cell counter-ImageJ)
- Software para gráficas y análisis estadísticos (Grap Pad Prism 6)
- Vernier digital (Truper)

- Micrótopo para bloques de parafina (RM2245, Leica)
- Microscopio de campo claro (DM500, Leica) con cámara (5.0 RTV, Micropublisher)

### Consumibles

- Pipetas serológicas de 10 ml y 5 ml (Corning)
- Pipetor para cultivo celular (Labnet)
- Cajas de cultivo celular 75 cm<sup>2</sup> y 25 cm<sup>2</sup> (Corning)
- Criotubos de 2 ml (Corning)
- Tubos de 50 ml y 15 ml (Corning)
- Viales de 2 ml, 1.7 ml y 0.65 ml (Eppendorf)
- Placas de 6, 24, 96 pozos (Corning)
- Cajas Petri de 60 mm (Corning)
- Espátulas de plástico (Corning)
- Matraces de 500 ml (Kimax)
- Membranas de Polifluoruro de Vinilideno, PVDF (Bio-Rad)
- Cartucho de 70 cm para Gene-gun (Bio-Rad)
- Cell strainer 70 µm (Falcon)
- Jeringas de Insulina 0.5 ml (BD Ultrafine)

## METODOLOGÍA

---

### Diseño de las construcciones de ADN

Para el diseño de la construcción SP-E6E7m-KDEL se utilizaron las secuencias de SP y KDEL que se presentan en la Calreticulina humana. El antígeno E6E7m parte de la fusión de las proteínas E6 y E7 mutadas, esto con el fin de eliminar el riesgo oncogénico mediante la sustitución con glicinas en Cys-63 y Cys-106 para E6; y Cys-58 y Cys-61 así como delección de los aminoácidos 21-24 para E7. Para realizar las múltiples construcciones del antígeno E6E7m con las señales SP y/o KDEL se partió de la construcción de SP-E6E7m-KDEL. La secuencia de aminoácidos que componen a SP es MLLPVPLLLGLLGLAAAL, mientras que la nomenclatura KDEL se referiese a los aminoácidos que conforman dicha señal. Una vez que se concluyó el diseño del gen, éste se mandó sintetizar en la compañía Eurofins, Co. La secuencia SP-E6E7m-KDEL (938 pb) se encuentra depositada en el GeneBank con número de acceso KP898251.

Para evaluar si el sistema de envío y retención de antígenos en retículo endoplásmico funciona como vacuna de ADN se realizó una comparativa del efecto entre la construcción de SP-E6E7m-KDEL contra hCRT-E6E7m, donde ésta última presenta el uso de la calreticulina humana completa (flanqueada con sus respectivas señales SP y KDEL) unida al extremo amino del antígeno E6E7m. Debido a que el efecto antitumoral de la construcción de cCRT-E7 ya ha sido reportado por otros autores (Cheng et al. 2001; Kim et

al. 2004) decidimos utilizarla como control de referencia a lo largo de nuestros experimentos.

### Reacción en cadena de la polimerasa

Para la amplificación de genes por reacción de la cadena de la polimerasa (PCR) se ajustaron los cálculos para reacciones de 25 µl utilizando las condiciones descritas por el kit Promega Taq Polimerase. Se utilizaron los oligonucleótidos M13, cuyas secuencias son forward 5'GTAAACGACGGCCAGT-, y reverse 5'AACAGCTATGACCATG-. Las condiciones en el termociclador fueron las siguientes: 96°C por 5 minutos, 94°C por 45 segundos, 58°C por 30 segundos, 72°C por 45 segundos, después se realizaron 30 ciclos de 94°C, 58°C y 72°C con sus respectivos tiempos, y finalmente se realizó un último paso de 72°C por 5 minutos. Los productos de PCR se sometieron a electroforesis en agarosa 1% a 100 volts, y fueron teñidos con Gel-Red (Bio-tium) para su detección en el transiluminador UV (Bio-Rad).

### Digestión con enzimas de restricción

Las reacciones se ajustaron a 50 µl de volumen total conteniendo 250 ng de los plásmidos, 1 U de las enzimas con su respectivo buffer 1X (Promega). Se incubó la reacción a 37°C por 1 hora o por toda la noche para obtener una mayor cantidad de fragmento liberado. Los productos se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa 1% o gel de

acrilamida 15% (según se mencione), y fueron teñidos con Gel-Red (Bio-tium) para su detección en el transiluminador UV (Bio-Rad).

### Ligación de genes en plásmidos

Para obtener una mayor cantidad de vector e inserto para la ligación, se realizó la digestión de 1 µg del plásmido correspondiente en 50 µl de reacción y se incubó a 37°C por toda la noche. El inserto a ser clonado fue purificado por el kit Gene clean (Genscript), mientras que el vector solamente fue desfosforilado con fosfatasa alcalina (NEB). El kit para la ligación fue el sistema T4 ligasa (Promega), donde cada reacción de ligación fue ajustada a 100 ng de ADN total con una relación 3:1 (inserto:vector) en 15 µl de volumen total. La reacción fue incubada a 4°C por toda la noche.

### Obtención de bacterias *Escherichia coli* calciocompetentes

Se sembraron 20 µl del stock de *Escherichia coli* DH5α (almacenado a -80°C) en 5 mL de medio LB, y se dejó incubando a 37°C toda la noche con agitación a 100 rpm. Al día siguiente se pasaron 2 ml del cultivo a 100 ml de medio LB fresco, y nuevamente se dejó incubando a 37°C con agitación hasta alcanzar una OD<sub>600</sub> de 0.35-0.45 (alrededor de 1.5-2 horas). Se incubó en hielo por 10 minutos, se colectó la pastilla celular por centrifugación a 4000 rpm por 5 minutos a 4°C, y posteriormente se resuspendió en 10 ml (frío) de CaCl<sub>2</sub> 0.075M/15 % de glicerol dejando en incubación en hielo por 5 minutos. Nuevamente se

centrifugó, resuspendió e incubó la pastilla con la solución  $\text{CaCl}_2$ /glicerol. Finalmente, se volvió a centrifugar y la pastilla fue resuspendida en 2 ml de la solución de  $\text{CaCl}_2$ /glicerol. Manteniendo la cadena de frío, se realizaron alícuotas de 50  $\mu\text{l}$  en tubos Eppendorf de 1.5 ml y se almacenaron a  $-80^\circ\text{C}$  hasta su uso.

### Transformación de bacterias *Escherichia coli* calciocompetentes

Se tomó un vial con 50  $\mu\text{l}$  de bacterias calciocompetentes almacenadas a  $-80^\circ\text{C}$ , se descongeló en hielo (aproximadamente 10 minutos). Se añadió el ADN (1-50 ng, sin superar el 10% del volumen total) y se incubó en hielo por 20 minutos. Para realizar el choque térmico se sumergió el vial en baño de agua a  $42^\circ\text{C}$  por 45 segundos, y después en hielo por 3 minutos. Se añadió 450  $\mu\text{l}$  de medio SOC (20 mM de glucosa en medio LB) y se incubó a  $37^\circ\text{C}$  con agitación por 30 minutos. Se plaquearon en relación 1:10 y 9:10 (50  $\mu\text{l}$  para ambos casos) de las bacterias en Agar LB con el antibiótico de selección (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  para Kanamicina, y 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  para Ampicilina). Se incubaron las placas Petri a  $37^\circ\text{C}$  por toda la noche. Al día siguiente se seleccionaron colonias para evaluar la presencia del plásmido.

### Purificación de plásmidos

Se activaron las bacterias recombinantes de cada construcción en 5 ml de LB con el antibiótico de selección (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  para Kanamicina, y 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  para Ampicilina) y se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  con agitación por toda la noche. Se colectó la pastilla celular de 3ml del cultivo de cada construcción en su respectivo tubo Eppendorf de 1.5 ml. Posteriormente,



cada pastilla se resuspendió por vortex en 200 µl de Solución I, después se añadió 400 µl de la Solución II, se mezcló por inversión suave y se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron 300 µl de la Solución III, se mezcló por inversión, se incubó en hielo por 10 minutos y después se centrifugó a 14 000 rpm por 10 minutos a 4°C. Se colectó el sobrenadante en un nuevo tubo, se añadió un volumen igual de isopropanol frío y se incubó en hielo por al menos 10 minutos. Se centrifugó nuevamente a 14 000 rpm por 10 minutos a 4°C. La pastilla de ADN obtenida fue lavada con etanol 70%, y una vez seca fue resuspendida en agua MQ.

### Cultivo celular

Las células HEK-293 fueron cultivadas en medio DMEM suplementado con FBS 10 %, glutamina 2 mM, piruvato 1x, antibiotico-antimicótico 1x.

Las células TC1: Fueron cultivadas en medio RPMI 1640 suplementado con FBS 10%, piruvato 1x, antibiotico-antimicótico 1x, 400 µg/ml de G418.

Los esplenocitos (células de bazo murino) son un cultivo primario obtenido tras el macerado del bazo murino con ayuda de un émbolo sobre una malla metálica en un pozo de placa de 6 pozos conteniendo 4 ml de RPMI sin suplementar. Después, se centrifugaron a 300 g por 5 minutos y se decantó el sobrenadante. Para eliminar los eritrocitos la pastilla obtenida fue resuspendida en 1 mL buffer ACK frío, se incubó por 1 minuto y se inactivó con 6 ml de RPMI sin suplementar. Se centrifugó a 300 g por 5 minutos y se decantó el sobrenadante. La pastilla se resuspendió en 6 ml de RPMI 10 % y se realizó el conteo celular. Las células se

mantuvieron en medio RPMI 1640 suplementado con FBS 10%, piruvato 1x, antibiotico-antimicótico 1x,  $\beta$ -mercaptoetanol 50  $\mu$ M y 2.5-5U/ml de IL-2.

Las células mononucleares de bazo murino son un cultivo primario obtenido tras la centrifugación de los esplenocitos con Ficoll-Paque (GE Health Care Systems), obteniendo la fracción de células mononucleares, en las cuales predominan la presencia de linfocitos y monocitos. Las células se mantuvieron en medio RPMI 1640 suplementado con FBS 10%, piruvato 1x, antibiotico-antimicótico 1x,  $\beta$ -mercaptoetanol 50  $\mu$ M y 2.5-5U/ml de IL-2.

#### Detección de la expresión de las proteínas recombinantes por Western blot

Se sembraron  $3 \times 10^5$  células/pozo de la línea celular HEK-293 y se transfectaron con 4  $\mu$ g de plásmido/pozo y 6  $\mu$ l de Turbofect (ThermoFisher Scientific). A las 24 hrs las células fueron colectadas, lavadas con PBS 1x frío, y lisadas con 60  $\mu$ l de buffer RIPA en hielo por 10 minutos. Se cuantificaron los extractos celulares usando Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) utilizando BSA para la curva de estándares. Se cargaron 25  $\mu$ g de proteínas totales en un gel de acrilamida al 15 % y se corrió la electroforesis (Bio-Rad) en Tris-glicina 1x a 100 volts. Después, las proteínas en el gel fueron transferidas a una membrana de PVDF (Bio-Rad) a 120 mA por 20 minutos en una cámara Trans-Blot (Bio-Rad) usando buffer de transferencia. La membrana se bloqueó con TBS-Tween con 10% leche descremada por 1 hora en agitación a 4°C. Se desechó la solución de bloqueo, se añadió el anticuerpo monoclonal anti-E7 (Santa Cruz) en una dilución 1:3 000 y se incubó en agitación a 4°C por toda la noche. La membrana fue lavada en tres ocasiones con TBS-Tween con

incubaciones de 10 minutos con agitación a temperatura ambiente. Posteriormente, se utilizó un anticuerpo anti-IgG1 murino conjugado con HRP, a una dilución de 1:10 000, y se incubó por 2 horas en agitación a 4°C. Se realizó nuevamente 3 lavados a la membrana. Se realizó la detección por quimioluminiscencia usando el sustrato Supersignal West Pico (Thermo Fisher Scientific) y se registró usando el film fotográfico (Kodak). Una vez registrada la señal, la membrana se lavó con Restore Western Blot Stripping Buffer (Thermo Fisher Scientific) por 5 minutos a 4°C, esto es con la finalidad de eliminar los anticuerpos previamente utilizados y la membrana pueda ser reutilizada para nuevas detecciones partiendo desde la solución de bloqueo. La misma membrana fue procesada para la detección de actina y E6 (Santa Cruz) en ese orden.

#### Detección de la localización subcelular de las proteínas recombinantes por inmunofluorescencia

Se sembraron  $5 \times 10^4$  células/pozo en placas de 24 pozos, a las cuales previamente se les colocaron cubreobjetos sanitizados en el fondo. Una vez adheridas al cubreobjetos (12 horas), las células fueron transfectadas con 2 µg de los distintos plásmidos usando 4 µl de Turbofect (Thermo Fisher Scientific). Al día siguiente, se retiró el medio y se lavaron las células con PBS 1x frío, después fueron fijadas por metanol:acetona (1:1) frío por 1 minuto, e inmediatamente después fueron lavadas con PBS 1x frío. Se incubó en una solución de bloqueo (PBS 1x con 3% suero de caballo) por 1 hora en agitación suave a 4°C. Después, se retiró la solución de bloqueo y se incubó con los anticuerpos primarios de anti-E7 y anti-

calnexina (Santa Cruz), a una dilución de 1:500 por toda la noche a 4°C en agitación suave. Después se lavaron por 3 ocasiones con PBS 1x frío, se incubó con los anticuerpos secundarios anti-mouse Alexa Flour 594 y anti-rabbit Alexa Flour 488 a una dilución de 1:500 por 2 horas a 4°C en oscuridad. Se realizaron nuevamente 3 lavados. Los cubreobjetos fueron montados en portaobjetos usando Vecta Shield con DAPI (Vector Laboratories) y se analizaron en microscopio confocal LSM 710 (Carl Zeiss). Para analizar la distribución del retículo endoplásmico a lo largo de la célula se realizó una inmunofluorescencia utilizando anti-calnexina y anti-actina siguiendo el mismo protocolo, así como análisis por contraste de fases para observar la extensión total del límite celular.

#### Preparación de cartuchos de ADN para inmunización por biobalística

La purificación de los plásmidos destinados a biobalística fue realizada con el Qiagen Plasmid Midi Prep kit siguiendo las indicaciones descritas por el fabricante, con excepción a la resuspensión del ADN donde se utilizaron 70 µl de agua MQ supliendo el uso del buffer TAE 1X por causar interferencia en pasos posteriores. El protocolo descrito a continuación fue tomado del proveedor del sistema Gene gun (Bio-Rad) para obtener 1 µg de ADN/cartucho. Se pesaron 25 mg de partículas de oro de 1 µm en un tubo Eppendorf de 1.5 ml, se adicionaron 50 µl de espermidina 0.05M (Sigma), se agitó vigorosamente por 1 minuto en vortex y se sonicó por 5 segundos para mayor homogenización. Se adicionaron 50 µg del ADN (50 µl) y se agitó vigorosamente por 5 segundos y, manteniendo la mezcla en vortex, se añadieron lentamente 50 µl de CaCl<sub>2</sub> 1M. Se dejó sedimentar por 10 minutos

a temperatura ambiente, se centrifugó y se desechó el sobrenadante. Se resuspendió el pellet con el remanente del sobrenadante y se dio vortex. Se lavó la pastilla con 1 ml etanol 100% (Sigma) por 3 ocasiones, y finalmente se resuspendió en 3 ml de PVP 0.1 mg/ml (preparado en etanol 100%) en un tubo de 15 ml.

Se conectó el tubing prep station al tanque de óxido nítrico, se colocó una tira de 60-70 cm de tubo para cartucho y se pasó el gas por 15 minutos a un flujo de 0.4 LPM. Después se cerró la válvula y con ayuda de una jeringa de 10 ml se llenó el tubo con los 3 ml de la mezcla homogenizada de ADN:Oro evitando la formación de burbujas así como la sedimentación del oro. Se colocó rápidamente el tubo dentro de la tubing prep station pasando por el anillo O-metálico y se dejó sedimentar por 5 minutos. Después, con ayuda de la jeringa se retiró el sobrenadante a una velocidad 1-2 cm/segundo, se desconectó la jeringa, se giró el tubo 180° para que se distribuyese el oro por 4 segundos, y después se dejó girando el tubo por espacio de 45 segundos antes de abrir el gas a 0.3 LPM. Se dejó secar por 5 minutos, se cerró la válvula, el tubo fue cortado en cartuchos de 1 cm con ayuda del equipo proporcionado por Bio-Rad. Los cartuchos fueron almacenados a 4°C en presencia de gel de sílice.

### Estimulación de esplenocitos

Para evaluar la capacidad de despertar una respuesta inmune específica a antígeno se realizó la inmunización de murinos hembras C57BL/6 de 6-7 semanas de edad divididos en grupos de 3 por cada tratamiento. Los murinos fueron inmunizados con 1 µg de ADN en

abdomen por biobalística a 300 psi en dos ocasiones espaciadas por 7 días. A los 14 días tras la última inmunización, los murinos fueron sacrificados y se procesaron los bazo de manera individual. Los esplenocitos obtenidos se plaquearon  $2 \times 10^6$  células/ml con 2.5 U/ml de IL-2 en placas de 24 pozos en presencia de 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de los epítopos específicos de E6 o E7. Para el control negativo se utilizó PBS, y para el control positivo con PHA a una concentración de 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Los cultivos se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  a 5%  $\text{CO}_2$  por 48 horas.

#### Detección de INF- $\gamma$ por ELISA

La evaluación se realizó a partir por los sobrenadantes de los cultivos de esplenocitos previamente mencionados. Se tomaron 50  $\mu\text{l}$  de los sobrenadantes para usarlos en el kit Mouse IFN-gamma Platinum ELISA (Ebioscience) siguiendo las instrucciones por el fabricante. Se utilizó el lector de placas iMark de Bio-Rad.

#### Detección de INF- $\gamma$ específico a E6 y E7 por citometría de flujo

La evaluación se realizó a partir de los cultivos de esplenocitos previamente mencionados. Se tomaron  $1 \times 10^6$  células de cada pozo, se pasaron a tubos Eppendorf de 1.5 ml y se lavaron en 2 ocasiones con buffer FACS frío usando centrifugaciones de 400 g por 5 minutos a  $4^\circ\text{C}$ . Se incubaron las células con el anticuerpo anti-CD8 marcado con FITC (Miltenyi) en 50  $\mu\text{l}$  de FACS por espacio de 30 minutos, y a partir de este momento todos los pasos posteriores fueron manteniendo las células en frío y en oscuridad. Se realizaron 3 lavados con buffer FACS, se añadieron 100  $\mu\text{l}$  de CytoFix (eBioscience) en vortex y se

incubaron en hielo por espacio de 10 minutos. Se añadieron 900 µl de buffer FACS, se centrifugaron los tubos y se lavaron las pastillas por 2 ocasiones más. Se resuspendieron las pastillas en 400 µl de CytoPerm (eBioscience) y se incubaron por 20 minutos. Se centrifugaron nuevamente, las pastillas se resuspendieron en 50 µl de CytoPerm preparado en con anticuerpo intracelular IFN-γ marcado con PE (Miltenyi) y se incubaron por 30 minutos. Se añadieron 400 µl de CytoPerm, se centrifugaron, y después se realizaron 2 lavados con FACS. Las células se dejaron resuspendidas en 400 µl de buffer FACS y se almacenaron a 4°C en oscuridad hasta su lectura al citómetro Accuri C6 de BD Biosciences. Se utilizaron células sin marcar como control de fluorescencia basal, así como controles marcados con cada fluorocromo por separado.

#### Detección de INF-γ específico a E7 por ELISpot

Los esplenocitos destinados para este ensayo se dejaron incubar en 5 ml de RPMI 10% en tubos de 15 ml por toda la noche a 4°C con la finalidad de eliminar las células apoptóticas y el debris resultante que se genera durante la adaptación a la transición de *in vivo* a *in vitro*. Al día siguiente se cambió por RPMI 10% nuevo, y se procesaron para la separación de células mononucleares utilizando Ficoll-Paque (GE Health Care Systems). Posteriormente, en la placa del kit Mouse IFN-gamma/Granzyme B Dual-Color ELISpot Kit se sembraron  $1 \times 10^6$  mononucleares por pocillo. Las condiciones del cultivo fueron 2.5 U/ml de IL-2 con 1 µg/ml del epítipo de E7. Como control negativo fue la ausencia del estímulo de E7, y como control positivo se incubó con PHA a 25 pg/ml. Los cultivos se incubaron a

37°C a 5% CO<sub>2</sub> por espacio de 48 horas en ausencia de movimientos bruscos que perturbasen el cultivo. Posteriormente, se procesó la placa siguiendo las instrucciones del kit y los pocillos fueron fotografiados por la cámara Micropublisher 5.0 RTV montada en un estereoscopio Leica L2. Finalmente, en las fotografías se contaron manualmente los spots utilizando Cell counter de ImageJ.

### Ensayo antitumoral profiláctico

Para evaluar el efecto antitumoral protector por la inmunización con las construcciones de ADN se utilizaron murinos hembras C57BL/6 de 6-7 semanas de edad divididos en grupos de 5 por tratamiento. Los murinos fueron inmunizados con 1 µg de ADN en abdomen por biobalística a 300 psi en dos ocasiones espaciadas por 7 días. Una semana después de la última inmunización se retaron los murinos con 5x10<sup>4</sup> células TC-1 mediante la inyección subcutánea en el costado derecho del murino. Se registró el crecimiento tumoral usando un vernier digital cada dos días, y se calculó el volumen usando la siguiente fórmula:  $(\text{Diametro mayor} * (\text{Diametro menor}^2)) / 2$ . Además se realizaron tablas de sobrevivencia, considerando el día de muerte de los murinos. Los murinos cuyo tumor superaba los 1 500 mm<sup>3</sup> de volumen fueron sacrificados.



### Ensayo antitumoral terapéutico en modelo subcutáneo

Para este ensayo se utilizaron murinos hembras C57BL/6 de 6-7 semanas de edad divididos en grupos de 5-10 por tratamiento. Se implantaron  $5 \times 10^4$  células TC-1 por murino mediante inyección subcutánea en el costado derecho. Al día 3 y 10 del implante se inmunizaron los murinos con 1  $\mu$ g de ADN en abdomen por biobalística a 300 psi. Se registró el crecimiento tumoral usando un vernier digital cada dos días, y se calculó el volumen usando la siguiente fórmula:  $(\text{Diametro mayor} * (\text{Diametro menor}^2)) / 2$ . Además, se realizaron tablas de sobrevivencia considerando el día de muerte de los murinos. Los murinos cuyo tumor superaba los 1 500 mm<sup>3</sup> de volumen fueron sacrificados.

### Ensayo antitumoral terapéutico en modelo de metástasis

Para el modelo de metástasis se utilizaron murinos hembras C57BL/6 de 6-7 semanas de edad en grupos de 5 por tratamiento. Éstos fueron retados en el día 0 con  $1 \times 10^4$  células TC-1 por murino, y fueron inoculadas a través de inyección en la vena lateral de la cola. Éstos recibieron las inmunizaciones al día 3 y 10, las cuales consistieron en 1  $\mu$ g de ADN en el abdomen a 300 psi. Posteriormente, los murinos fueron sedados al día 25 con ketamina y xilacina (160 mg/kg y 30mg/kg), y se realizó una perfusión intracardiaca con PFA al 4%. Los pulmones se post-fijaron en PFA al 4% y se realizó el conteo de los focos tumorales presentes a lo largo de la superficie pulmonar para después ser procesados para su inclusión en parafina.

### Detección de expresión de LacZ

Se utilizó la construcción comercial pcDNA 4/TO/LacZ (Thermo Fisher Scientific) como plásmido reportero para verificar la expresión de proteínas recombinantes en la piel de los murinos tras recibir el tratamiento por biobalística. Se prepararon cartuchos pcDNA 4/TO/LacZ en base a lo descrito y se realizó una aplicación de 1 µg de ADN por murino (3) en abdomen y muslo a 300 psi. Después de 48 horas se sacrificaron los murinos por dislocación cervical y se colectó la piel, así como intestino y músculo, dentro de la zona tratada. Los tejidos se fijaron en PFA 4% por un espacio de 90 minutos, se pasaron a 40 ml de solución de tinción X-Gal y se incubaron por espacio de 48 horas en agitación a 4°C para finalmente procesarlos para inclusión en parafina y análisis de cortes histológicos.

### Inclusión de tejidos en parafina

Los tejidos obtenidos fueron cortados en pequeños fragmentos menores a 5 mm de espesor y fueron fijados en PFA al 4% por un espacio de 24 horas. Se prosiguió con la deshidratación a través del pase de los tejidos en soluciones de etanol en sentido ascendente (60%, 70%, 80%, 90%, 96%, 100%, 100%), etanol:xilol (1:1), xilol (dos pases) y parafina (dos pases) por espacio de 1 hora en cada solución. Posteriormente, los tejidos fueron incluidos en bloques de parafina y se realizaron cortes de 5 µm de espesor en el micrótomos Leica RM2245. Los cortes fueron analizados en campo claro en un microscopio

Leica DM500. Algunos cortes fueron sometidos a tinción con hematoxilina y eosina, según se indique.

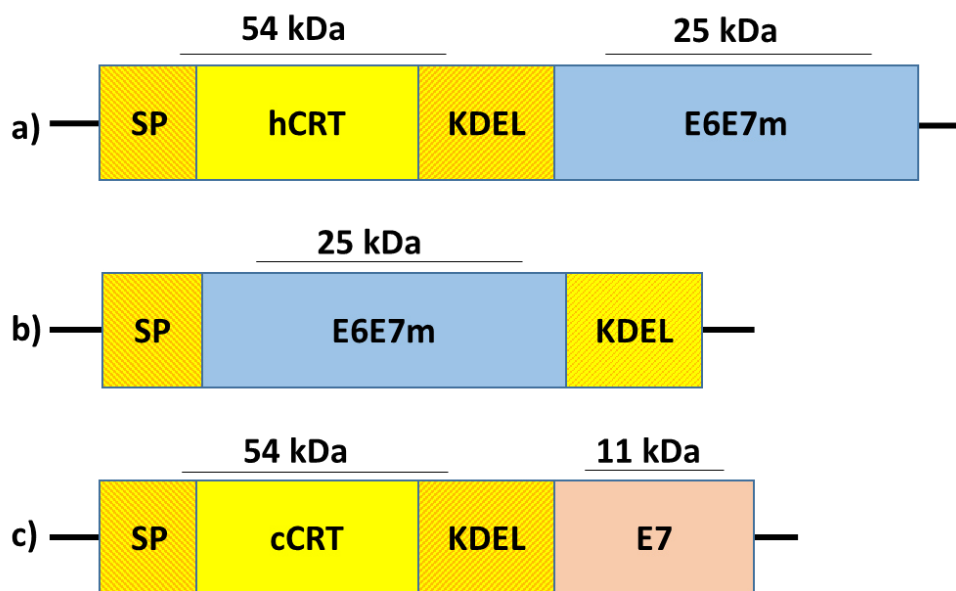
### **Análisis estadístico**

Se realizaron análisis de ANOVA de una o dos vías (según se especifique) y se utilizó la prueba de Tukey como análisis post-hoc usando el programa Prism (GraphPad Software, Inc). Se consideró diferencia significativa aquellos valores de  $p < 0.05$ . Los experimentos mostrados se realizaron dos veces como mínimo.

## RESULTADOS

### La fusión del antígeno E6E7m a las señales SP y KDEL promueve su envío a retículo endoplásmico

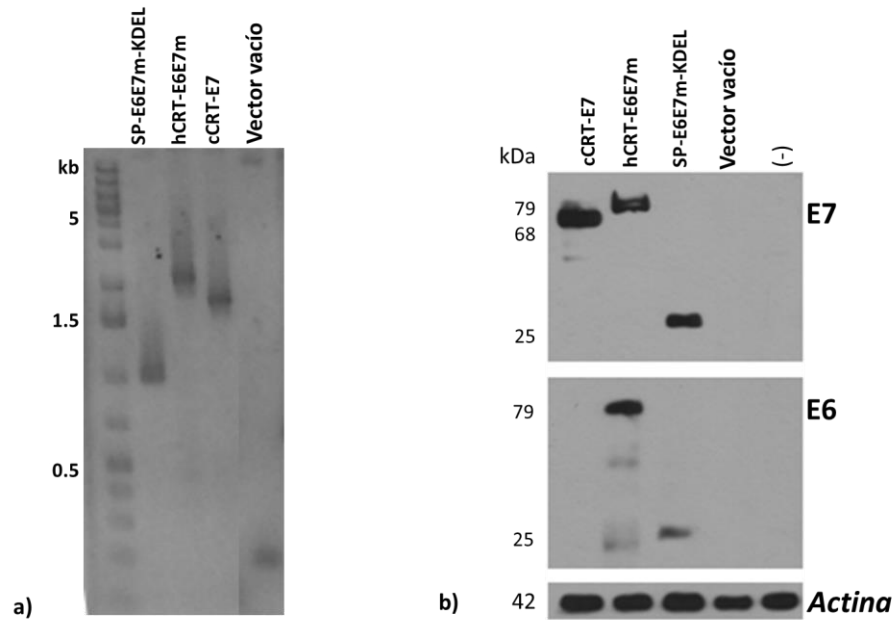
Para validar que la estrategia propuesta de envío y retención de antígenos a retículo endoplásmico usando las señales SP y KDEL funciona como vacuna de ADN fue necesario, en primer lugar, realizar la comparativa del efecto antitumoral entre las construcciones de SP-E6E7m-KDEL y hCRT-E6E7m. Como control de referencia se utilizó cCRT-E7 (Cheng et al. 2001) y como control negativo se utilizó el plásmido vacío pShuttle-CMV. A continuación se muestran los esquemas de las construcciones evaluadas (Figura 8).



**Figura 8. Esquema de las construcciones de ADN del antígeno E6E7m fusionado a CRT o SP-KDEL.** a) hCRT-E6E7m consiste en la fusión de la calrteticulina humana (con sus señales de SP y KDEL) en el extremo amino del antígeno E6E7m. b) cCRT-E7 consiste en la fusión de la calrteticulina de conejo (con sus señales de SP y KDEL) en el extremo amino del antígeno E7. c) SP-E6E7m-KDEL consiste en la fusión de la señal SP en el extremo amino y la señal KDEL en el extremo carboxi del antígeno E6E7m.

Primero se verificó que el tamaño del gen clonado correspondiera a cada una de las construcciones activadas a partir de stocks de bacterias; para esto se realizó un PCR de la zona de clonación del plásmido y se analizó por electroforesis en gel de agarosa. Se obtuvieron los fragmentos esperados de ~900 pb para SP-E6E7m-KDEL, uno de ~1800 pb para hCRT-E6E7m, y uno de ~1600 pb para, y cCRT-E7 (Figura 9a).

El siguiente paso fue corroborar que las construcciones sean capaces de expresar las proteínas recombinantes en células eucariotas; para esto, transfectamos la línea celular HEK-293 con las distintas construcciones, y tras 24 horas las células fueron procesadas para Western blot utilizando un anticuerpo anti-E7. En éste experimento se detectó una banda de 68 kDa correspondiente a la expresión de cCRT-E7, otra de 79 kDa para hCRT-E6E7m, y una de 25 kDa para SP-E6E7m-KDEL, debido a la eliminación de calreticulina en dicha construcción. Estos resultados coincidieron al usar anti-E6, con excepción para cCRT-E7 donde no se detectó señal alguna, como era de esperarse. Se analizó la expresión de  $\beta$ -actina como control de carga (Figura 9b).

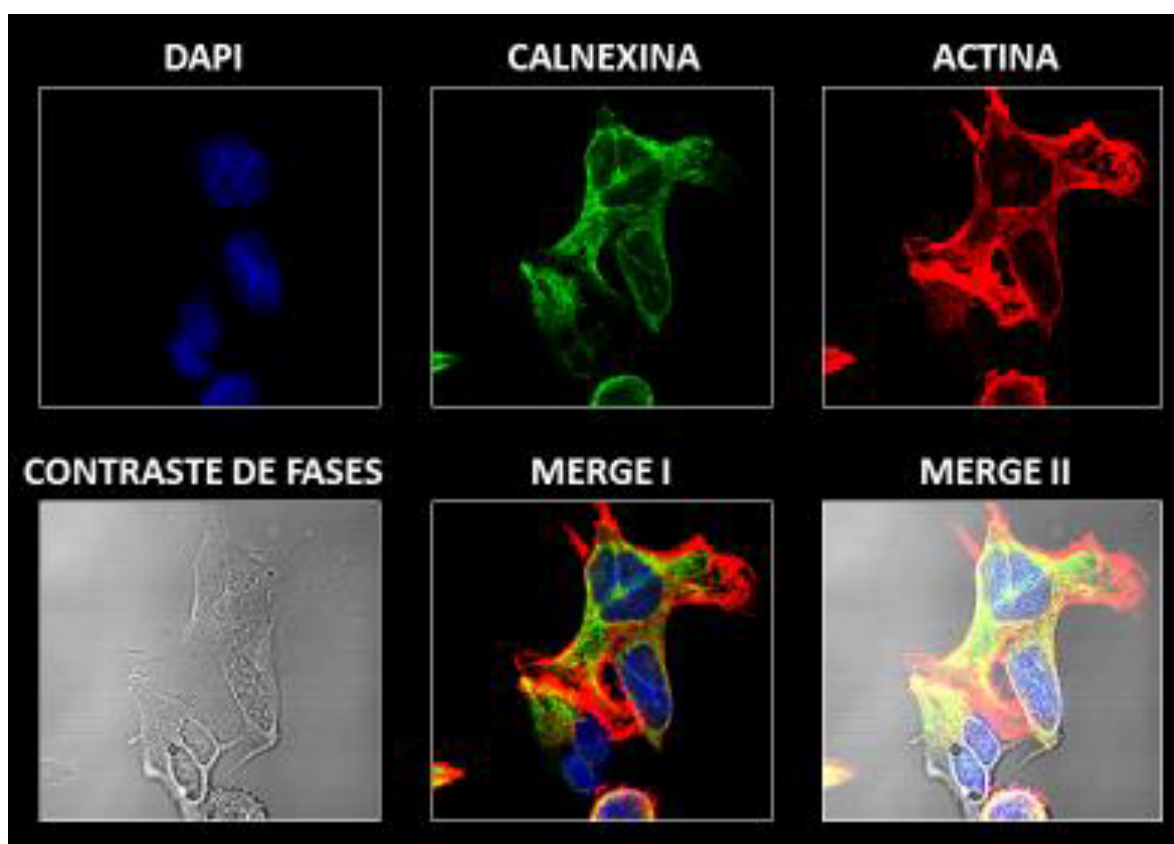


**Figura 9. Análisis por PCR y Western Blot de las construcciones E6E7m con CRT o SP-KDEL clonadas en pShuttle-CMV.** a) Electroforesis en gel agarosa al 1% de los productos de PCR. Se detectaron las bandas de ~900, 1800 y 1600 pb para SP-E6E7m-KDEL, hCRT-E6E7m y cCRT-E7 respectivamente. b) Por medio de western blot se detectaron señales de 79, 68 y 25 kDa correspondientes a cCRT-E7, hCRT-E6E7m y SP-E6E7m-KDEL, respectivamente, tras la detección de E7. Al detectar E6 solo se observan las señales correspondientes para hCRT-E6E7m y SP-E6E7m-KDEL. Se utilizó  $\beta$ -actina como control de carga.

Lo siguiente fue constatar que la fusión del antígeno E6E7m a las señales de SP y KDEL de calreticulina promovía el envío del antígeno hacia retículo endoplásmico, para lo cual se realizó una inmunofluorescencia y un análisis por microscopia confocal para detectar si existe colocalización entre el antígeno E6E7m y la calnexina, un marcador del lumen del retículo endoplásmico.

Para ello se analizó primero la distribución del retículo endoplásmico a lo largo de la célula para de esta manera saber su comportamiento y asegurarnos que la señal obtenida utilizando un anticuerpo anti-calnexina es específica y no por unión inespecífica a proteínas citoplasmáticas, por lo que utilizamos el marcaje con  $\beta$ -actina y contraste de fases para

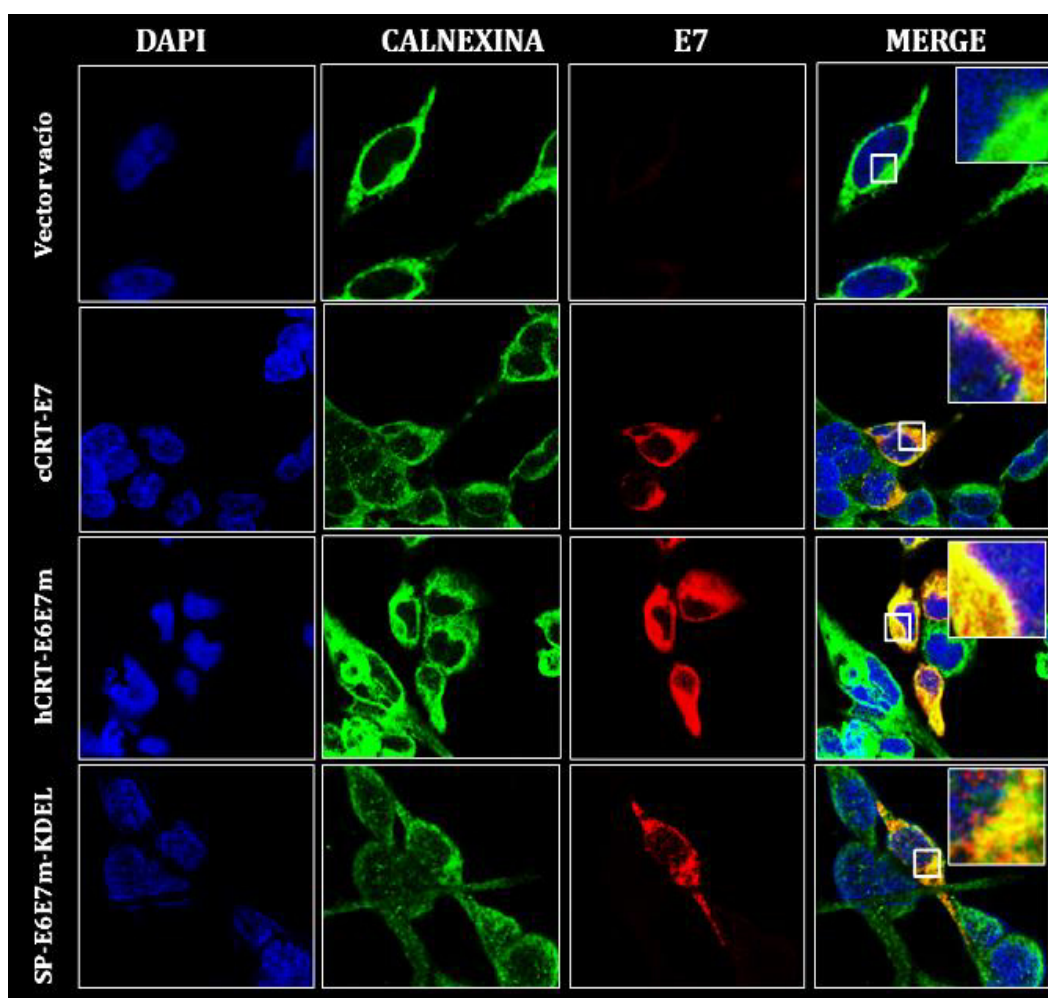
observar el límite celular. En el análisis confocal se observó que la señal para calnexina se encuentra distribuida a lo largo de la célula excepto en el área del núcleo y el límite celular. Para actina se detectó una señal más intensificada en la periferia celular; al momento de analizar el sobrelape de todas las señales se observó que no hay señal de colocalización entre actina y calnexina (Figura 10).



**Figura 10. Análisis por microscopia confocal de la distribución celular del retículo endoplásmico utilizando el marcador calnexina.** Las células HEK-293 fueron procesadas para inmunofluorescencia utilizando anticuerpos anti-calnexina detectado con anticuerpo secundario Alexa Fluor 488 (verde), y anti-actina detectado con anticuerpo secundario con Alexa Fluor 594 (rojo), se utilizó DAPI para teñir los núcleos (azul), y contraste de fases para el límite celular. Se muestra el sobrelape (merge I y II) de imágenes, donde se observa que no hay colocalización de señales. Imágenes tomadas al objetivo Plan-Apochromat 63x/1.40 Oil DIC M27.

Lo siguiente fue analizar la expresión de los antígenos en las células HEK-293 transfectadas con las distintas construcciones. En este experimento se observó una alta

colocalización entre la señal del antígeno E7 y calnexina en las células transfectadas con la construcción SP-E6E7m-KDEL, indicando así que dicho antígeno se localiza dentro del retículo endoplásmico. El anterior resultado también se obtuvo para hCRT-E6E7m y cCRT-E7, mientras que en nuestro vector vacío no se presentó señal alguna para el antígeno E7 (Figura 11). Con esto, comprobamos que la fusión del antígeno E6E7m con las señales SP y KDEL provocan el correcto envío y retención de los antígenos en el retículo endoplásmico.



**Figura 11. Análisis por microscopía confocal de la distribución subcelular del antígeno E6E7m a CRT o SP-KDEL.** Las células HEK-293 transfectadas con las distintas construcciones fueron procesadas para inmunofluorescencia utilizando anticuerpos anti-E7 y anti-calnexina y anticuerpos secundarios Alexa Fluor 594 (rojo) y Alexa Fluor 488 (verde), respectivamente. Se utilizó DAPI (azul) para teñir los núcleos. La señal amarilla indica una colocalización entre las señales de los fluorocromos de los anticuerpos para E7 y calnexina. Imágenes tomadas al objetivo Plan-Apochromat 63x/1.40 Oil DIC M27.

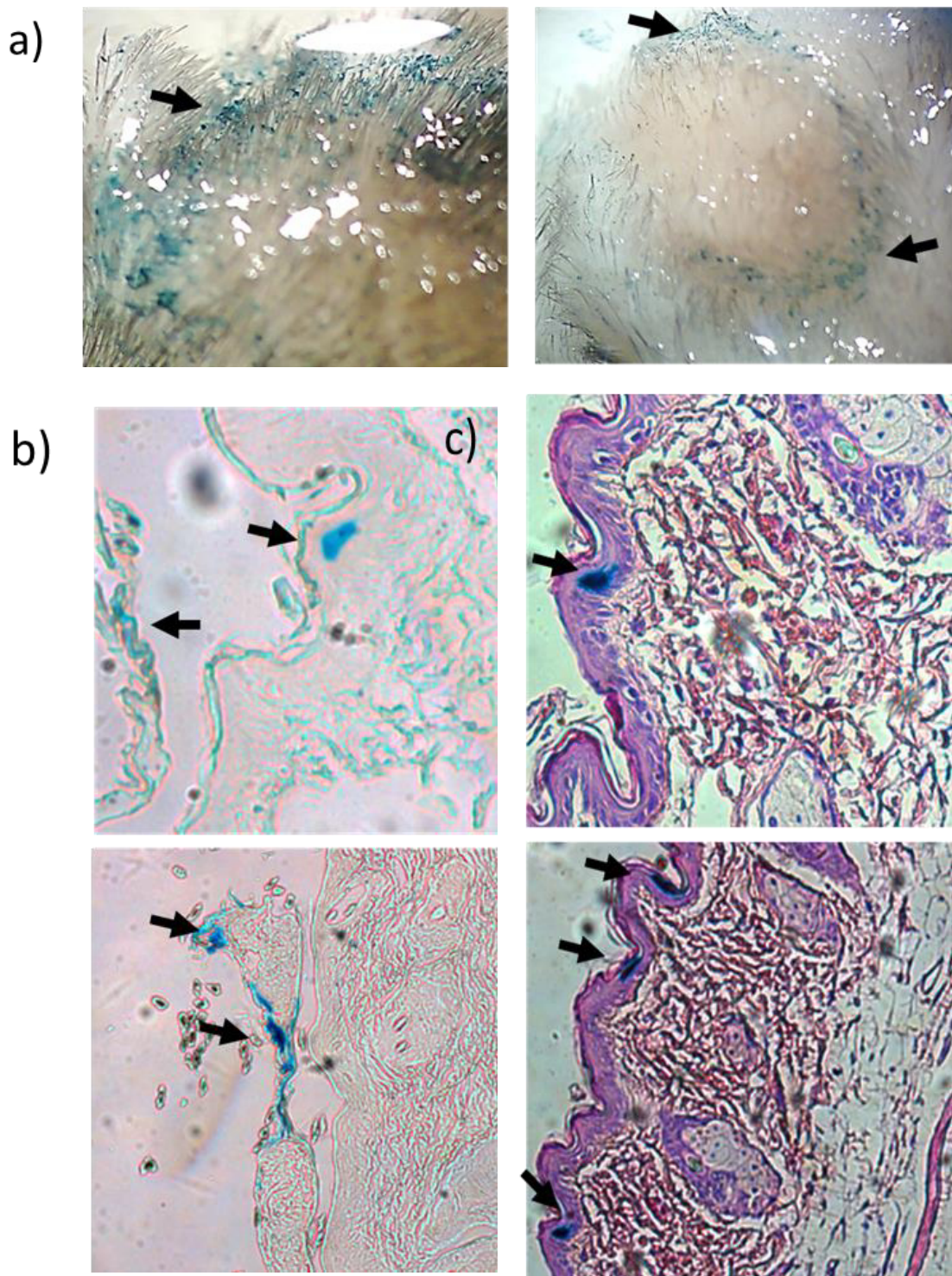


## Las construcciones de ADN se expresan en la epidermis tras su administración por biobalística

Debido a que es la primera vez en utilizarse el sistema de biobalística Gene gun (Bio-Rad) en el laboratorio, se decidió realizar un ensayo para comprobar si la entrega de genes realizada mediante este sistema se realiza de manera correcta en las condiciones utilizadas. Para esto se utilizó el plásmido pcDNA4/TO/lacZ que codifica para la enzima  $\beta$ -galactosidasa que es capaz de hidrolizar el X-gal obteniendo como producto un compuesto azul insoluble, el 5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-índigo.

Se prepararon los cartuchos de 1  $\mu$ g siguiendo el protocolo reportado por Bio-Rad. Éstos fueron administrados en el abdomen de los murinos y a las 48 horas se colectó la piel de la zona tratada para ser procesada por la técnica histoquímica con X-gal. Como control negativo se utilizó piel tratada con cartuchos vacíos.

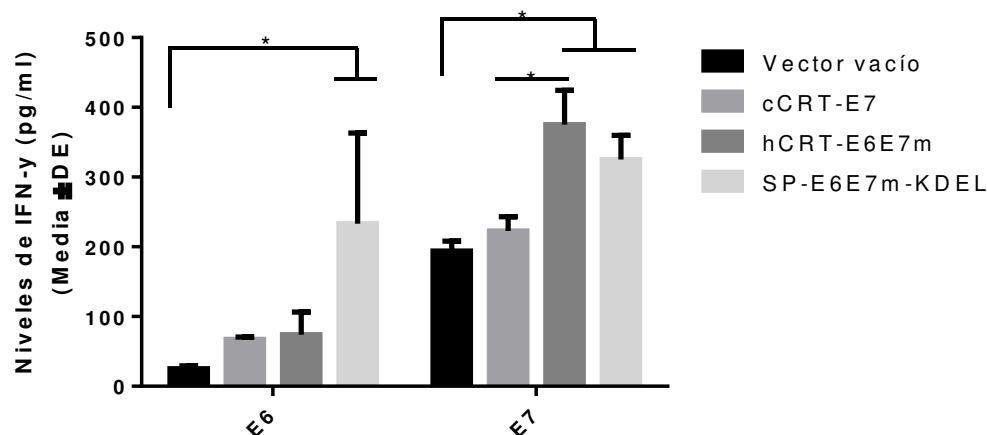
En el análisis macroscópico se observó la presencia de una coloración azul en la periferia de la zona tratada por biobalística (Figura 12a), mientras que en el control negativo no se detectó coloración alguna. Posteriormente se realizó un análisis de cortes histológicos, en donde corroboró que dicha señal azul se encuentra dentro de las células epiteliales de la epidermis, y esto se observó también en cortes sin tinción histológica (Figura 12b) y teñidos con hematoxilina y eosina (Figura 11c). Con este ensayo se corroboró la expresión en piel de las construcciones de ADN utilizadas en este trabajo bajo el sistema de biobalística.



**Figura 12. Detección de la expresión del plásmido pcDNA4/TO/lacZ transfectado en la piel por biobalística.**  
a) Imagen macroscópica del sitio de transfección tras la técnica histoquímica con X-gal. b y c) Micrografía en campo claro del corte del sitio de transfección (b) sin tinción y (c) con tinción H&E. Las flechas indican la presencia del compuesto indólico (azul) formado por la hidrólisis de X-gal por acción de la  $\beta$ -galactosidasa expresada.

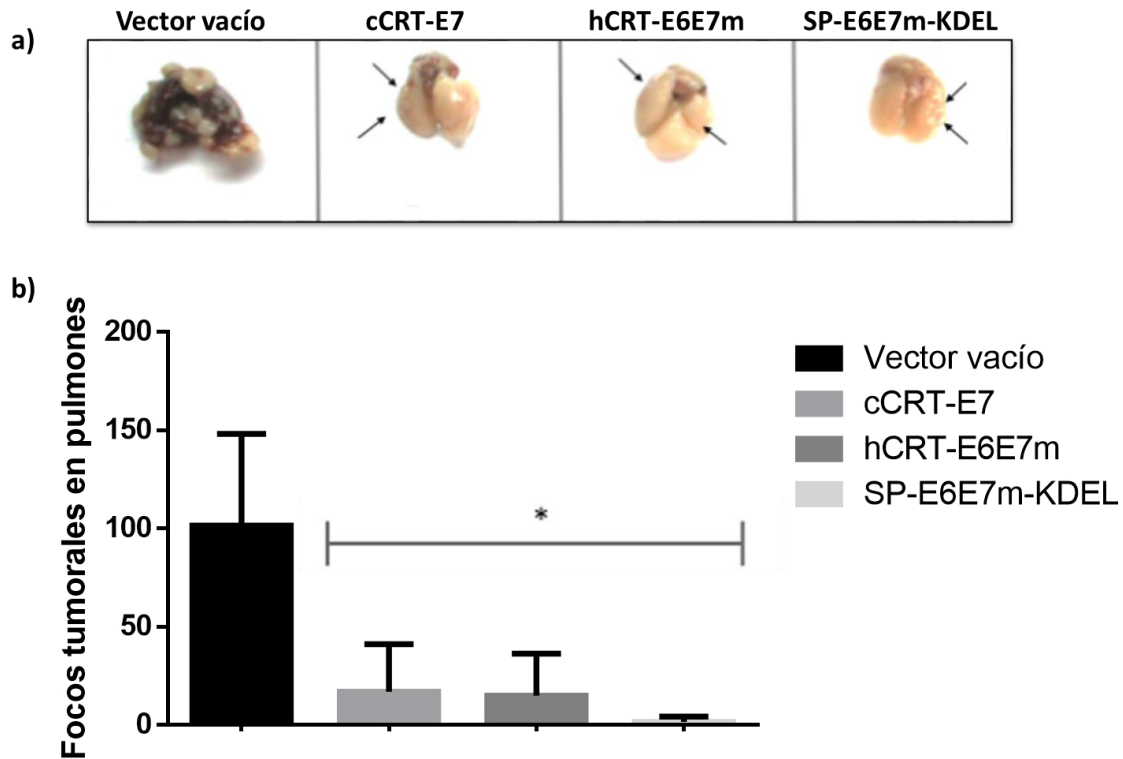
## La fusión del antígeno E6-E7 a SP y KDEL es capaz de generar un efecto antitumoral similar a la fusión a calreticulina completa

Para determinar si hay una activación de las funciones citotóxicas de la respuesta inmune celular se cuantificó la producción de IFN- $\gamma$  específico a antígeno por esplenocitos de los murinos inmunizados con las distintas construcciones. Para lo cual, los esplenocitos fueron cultivados *in vitro* bajo estimulación con los epítomos para E6 o E7; posteriormente, se cuantificó la producción de IFN- $\gamma$  específico al antígeno por ELISA. Los resultados indican que la inmunización con SP-E6E7m-KDEL es capaz de inducir un aumento significativo en la producción de IFN- $\gamma$  en respuesta al antígeno E6 en comparación al resto de los tratamientos. También se observó que la inmunización con SP-E6E7m-KDEL y hCRT-E6E7m induce una producción significativa de IFN- $\gamma$  en respuesta al antígeno E7 en comparación al resto de los tratamientos, pero sin presentarse una diferencia significativa entre ambos. Estos resultados nos indican que la inmunización con SP-E6E7m-KDEL es capaz de sensibilizar al sistema inmune celular de manera específica (Figura 13).



**Figura 13. Detección de IFN-γ específico por ELISA de esplenocitos en respuesta a inmunización con E6E7m fusionado a CRT o SP-KDEL.** Los murinos recibieron 2 inmunizaciones por biobalística con 1 µg de ADN en cada ocasión, posteriormente se colectaron esplenocitos y se incubaron bajo estimulación con el epítipo de E6 o E7, y se analizó la producción de IFN-γ específico a las 48 horas por la técnica de ELISA. \*p < 0.05.

Posteriormente nos enfocamos en evaluar si SP-E6E7m-KDEL es capaz de generar una respuesta inmune antitumoral. En el ensayo antitumoral se optó por implantar la línea tumoral TC-1 por vía intravenosa como modelo de cáncer metastásico, para evaluar la capacidad terapéutica por la inmunización con las distintas construcciones de ADN. Los murinos fueron sacrificados al día 25 post-implante para el análisis macroscópico en todos los órganos, siendo los pulmones los únicos en presentar focos tumorales (Figura 14a). En los pulmones fijados con PFA 4% se realizó el conteo de focos tumorales presentes en el epitelio y se obtuvo que hay una disminución significativa en los tratamientos cCRT-E7, hCRT-E6E7m, y SP-E6E7m-KDEL con respecto al control negativo; sin embargo, no se detectó diferencia significativa entre ellos (Figura 14b). Lo anterior sugiere que la estrategia de utilizar solamente las señales SP y KDEL de CRT es suficiente para despertar una respuesta inmune antitumoral terapéutica.

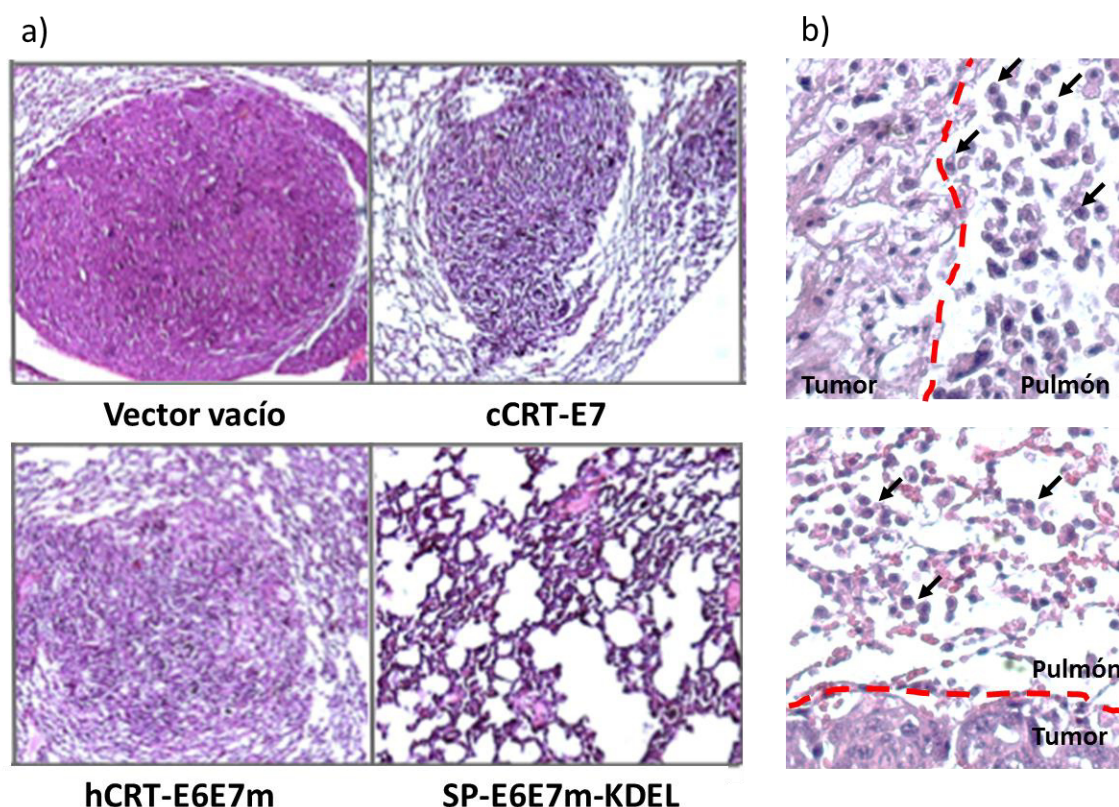


**Figura 14. Efecto antitumoral terapéutico por la inmunización con las construcciones de ADN del antígeno E6E7m fusionado a las señales SP-KDEL.** Los murinos recibieron el implante tumoral intravenoso seguido de las inmunizaciones según lo descrito anteriormente. Posteriormente el día 25 fueron sacrificados los murinos y se realizó la cuenta de focos tumorales en el epitelio pulmonar. a) focos tumorales en el epitelio pulmonar. b) Gráfica con el conteo de focos tumorales en los pulmones de los murinos con los distintos tratamientos. \*  $P < 0.05$ .

Posteriormente, en cortes histológicos de los pulmones se analizó la morfología de los focos tumorales, así como posibles lesiones remanentes tras la regresión tumoral. En la figura 15a se muestran cortes representativos de focos tumorales/lesiones (teñidos con hematoxilina y eosina) presentes en cada grupo. En el vector vacío se observó como el foco tumoral presenta cierta organización en el acomodo de las células tumorales, sin embargo, en cCRT-E7, hCRT-E6E7m, y SP-E6E7m-KDEL se presenta una disrupción en dicha organización, así como en algunos casos se presentaron pequeños cúmulos celulares desorganizados entre los alvéolos (SP-E6E7m-KDEL), indicando presencia de focos



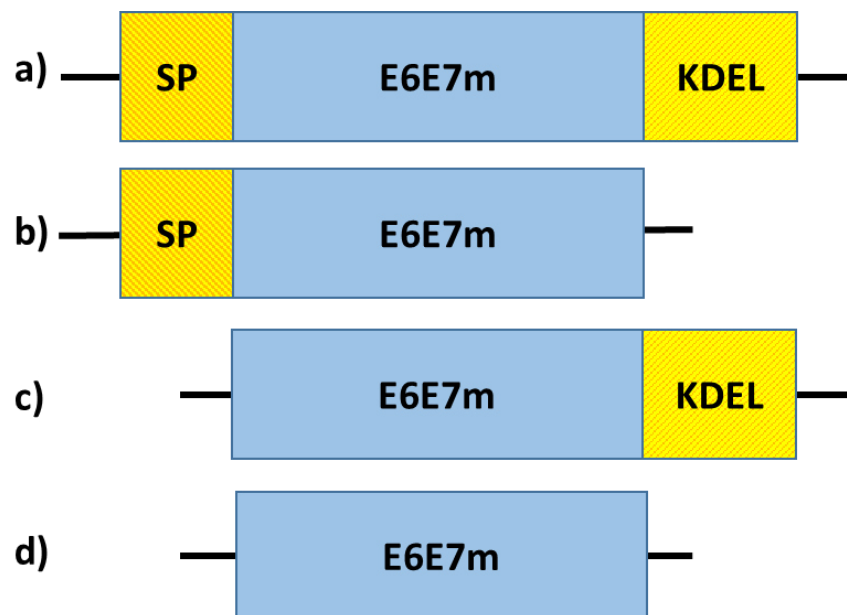
tumorales en involución lo cual ha sido descrito por otros autores (Amine et al. 2009). En algunos tumores o cúmulos celulares remanentes, tanto en grupos control como tratamientos, se detectó un infiltrado celular con características similares a leucocitos, principalmente a linfocitos por presencia de un núcleo prominente basófilo y citoplasma reducido (Figura 15b).



**Figura 15. Cambios morfológicos en los focos tumorales presentes en pulmones derivados del ensayo antitumoral terapéutico.** a) A los pulmones con mayor número de focos tumorales se procesaron para técnica histológica con tinción con hematoxilina y eosina. Se puede observar que hay una mayor desorganización en la estructura del foco tumoral de cCRT-E7, hCRT-E6E7m, y SP-E6E7m-KDEL con respecto al vector vacío. 40X. b) Presencia de infiltrado celular con características similares a leucocitos (flechas) en la periferia de algunos de los tumores remanentes. 100X.

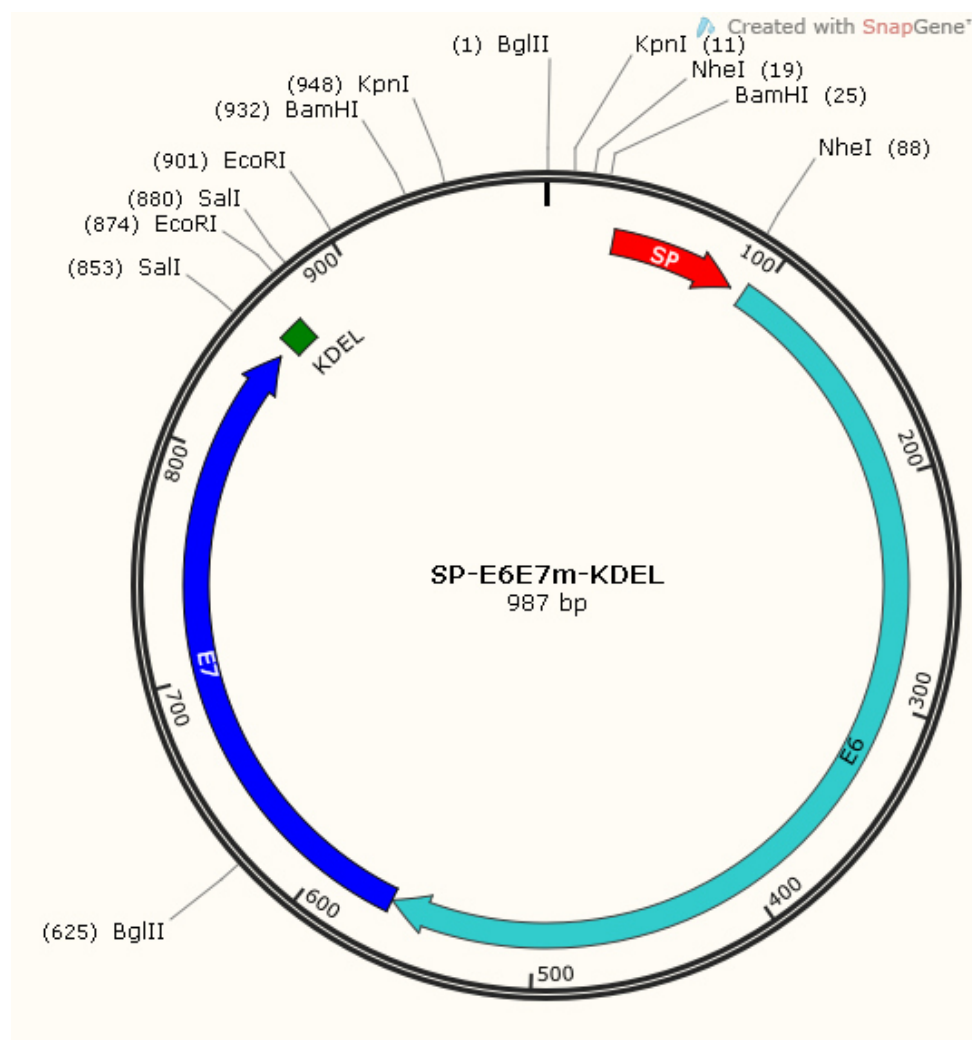
## La fusión del antígeno E6E7m a las señales SP ó KDEL por separado presenta distintos patrones de expresión

Para analizar si la señal KDEL utilizada para la retención del antígeno E6E7m en retículo endoplásmico es necesaria para obtener el efecto antitumoral observado se evaluaron distintas construcciones del antígeno E6E7m fusionado a SP y/o KDEL, las cuales derivaron de la escisión de las señales de la construcción SP-E6E7m-KDEL (Figura 16); éstas fueron subclonadas en el vector pUMVC4a. Se utilizó cCRT-E7 como control de referencia, y el vector vacío como control negativo.



**Figura 16. Esquema de las construcciones de ADN del antígeno E6E7m fusionado a SP y/o KDEL.** a) SP-E6E7m-KDEL consiste en la fusión del antígeno E6E7m con señal SP en el extremo amino terminal, y KDEL en el extremo carboxilo terminal. b) SP-E6E7m consiste en la fusión del antígeno E6E7m con señal SP en el extremo amino terminal. c) E6E7m-KDEL consiste en la fusión del antígeno E6E7m con señal KDEL en el extremo carboxilo terminal. d) SP-E6E7m-KDEL en el antígeno E6E7m sin señal alguna.

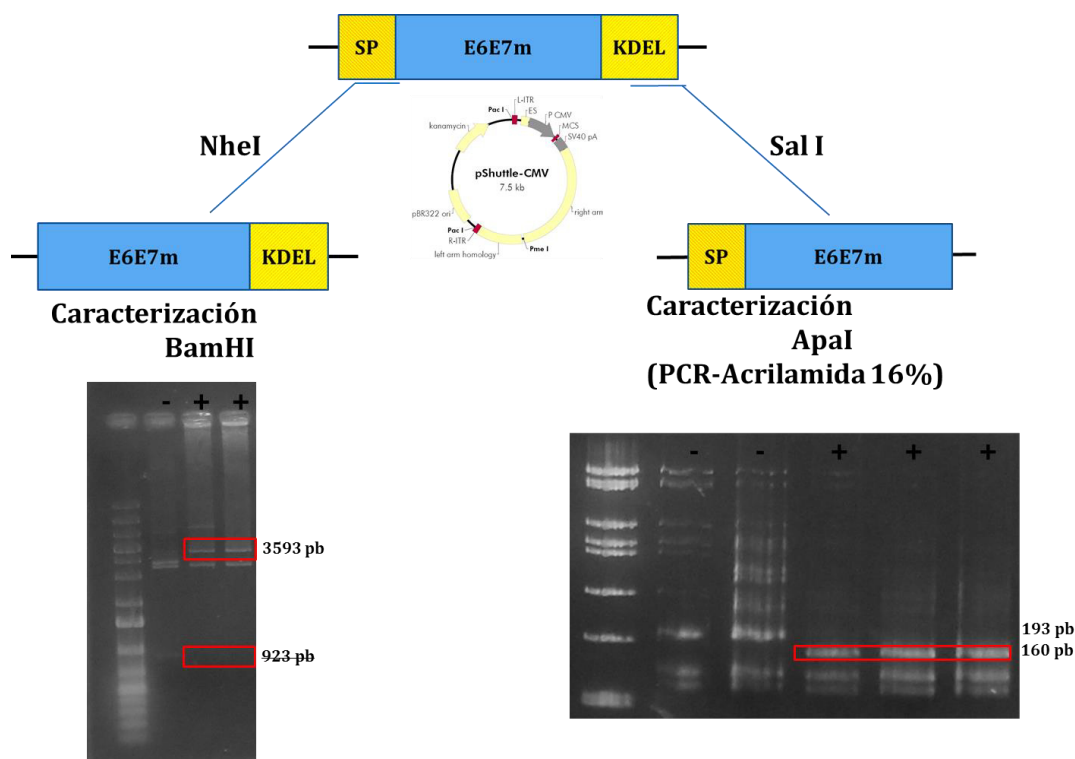
Desde el diseño inicial para SP-E6E7m-KDEL se contempló la adición de sitios de restricción que permitieran la eliminación de las señales SP y KDEL con diversas enzimas de restricción. En la figura 17 se muestra el mapa en formato circular del gen SP-E6E7m-KDEL con los sitios de restricción utilizados para eliminación de las señales y su posterior caracterización. La secuencia para el gen SP-E6E7m-KDEL se encuentra en el GeneBank bajo el siguiente número de acceso: KP898251.



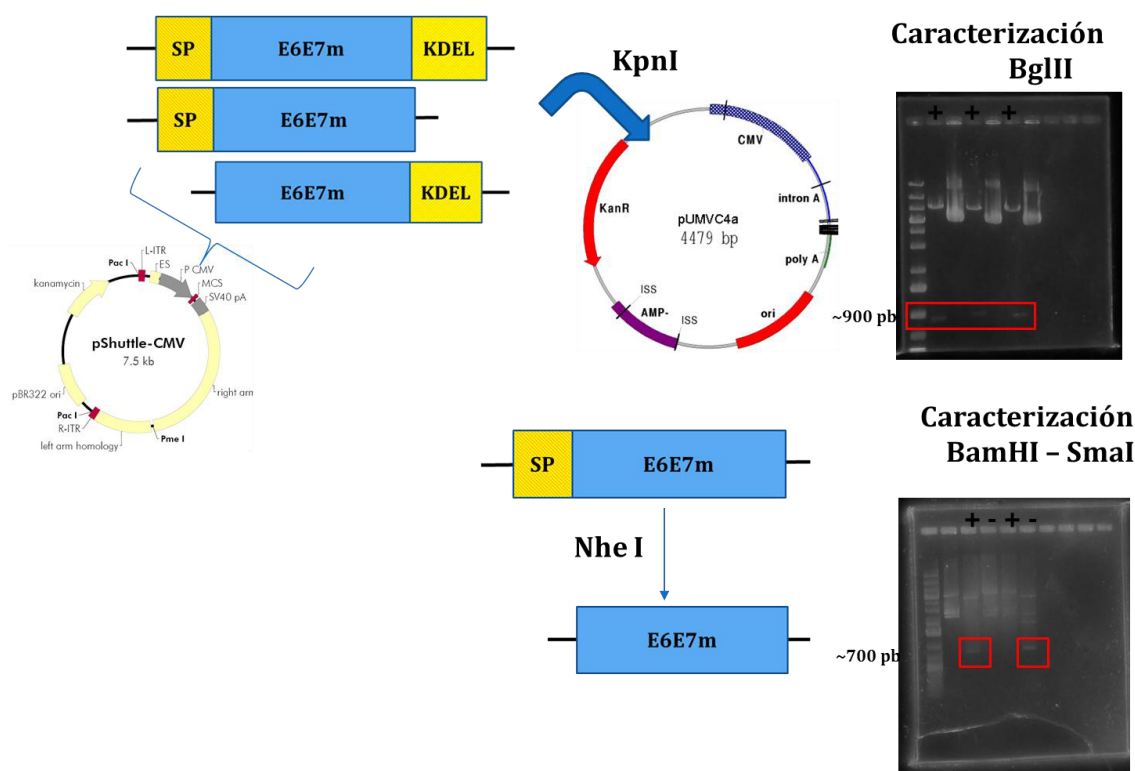
**Figura 17. Mapa de SP-E6E7m-KDEL y sus sitios de restricción.** Se muestra el mapa del gen SP-E6E7m-KDEL y los sitios de restricción colocados para la eliminación de las distintas señales. Por practicidad el mapa se representa en formato circular, la dirección del marco de lectura esta señalado por las flechas, y se señalan los sitios de restricción con su localización exacta entre paréntesis.



Debido a limitaciones con los sitios de restricción del vector pUMVC4a, la obtención de E6E7m-KDEL y SP-E6E7m se realizó desde el plásmido pShuttle-: SP-E6E7m-KDEL para después subclonarlos en pUMVC4. La eliminación de la señal SP fue través de una digestión con *NheI* y se caracterizó con *BamHI*, donde observamos que la construcción clonada en la dirección correcta presenta un fragmento de 3593 pb y es negativa para la banda de 923 pb; obteniendo así la construcción de E6E7m-KDEL. Mientras que para obtener SP-E6E7m, se eliminó la señal KDEL mediante la digestión con la enzima *SalI*, y para su caracterización se realizó una PCR del fragmento clonado seguido de una digestión con *Apal* y electroforesis en acrilamida, donde las colonias negativas generan un fragmento de 193 pb y las colonias positivas generan un fragmento de 160 pb (Figura 18).

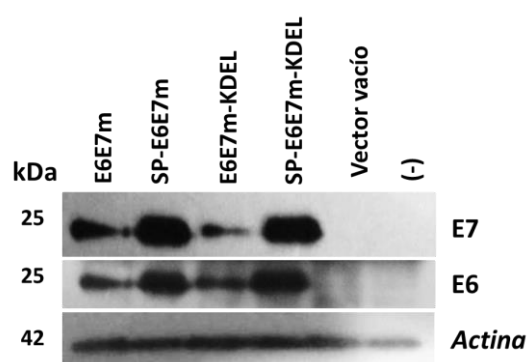


Posteriormente las construcciones anteriores fueron subclonadas en pUMVC4a utilizando *KpnI*, y fueron caracterizadas con *BglII* donde aquellas que estaban en la orientación correcta liberaron un fragmento de alrededor de 900 pb. A partir de la construcción de SP-E6E7m en pUMVC4a se obtuvo la construcción de E6E7m mediante la digestión con *NheI* y se caracterizó con *BamHI* y *SmaI* generando un fragmento de alrededor de 700 pb (Figura 19). Para subclonar cCRT-E7 se partió del plásmido pCDNA3 utilizando las enzimas *Apal* y *KpnI*, mientras que para su caracterización se utilizó la enzima *XbaI*.



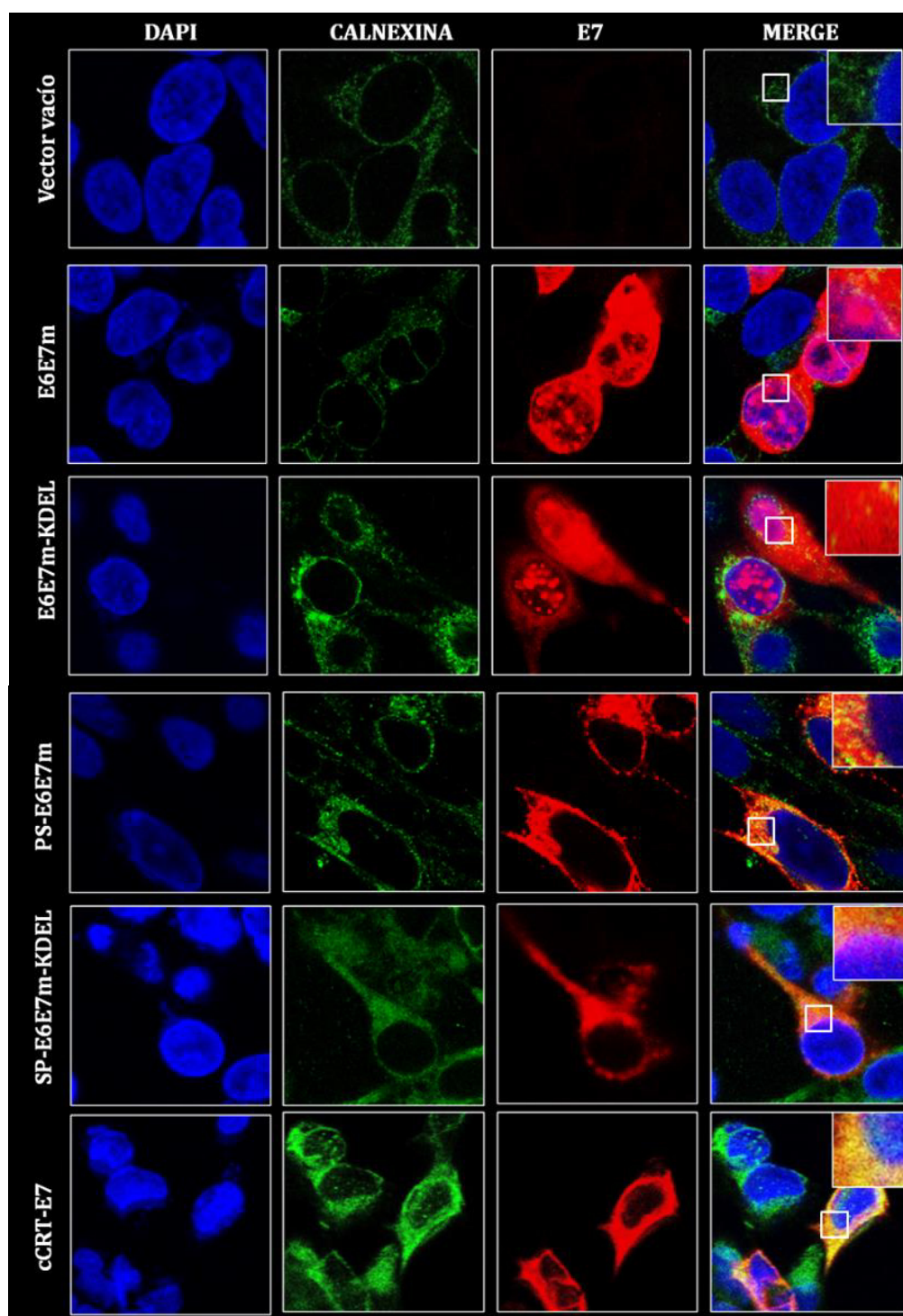
**Figura 19. Diagrama para la obtención de SP-E6E7m-KDEL, SP-E6E7m, E6E7m-KDEL y E6E7m en pUMVC4a.** Se muestra la subclonación de las diferentes construcciones en pUMVC4a, así como la estrategia para obtener E6E7m a partir de SP-E6E7m, con sus respectivas caracterizaciones.

Nuevamente fué necesario constatar que las construcciones sean capaces de expresar los genes clonados, por lo cual realizó un Western blot de células HEK-293 transfectadas con las distintas construcciones. Se detectó una señal de alrededor de 25 kDa correspondiente a la expresión de cada una de las distintas construcciones; sin embargo, la intensidad de ésta disminuye en aquellas construcciones que no presentan péptido señal. Éste resultado se presenta utilizando tanto anticuerpos anti-E6 como anti-E7 (Figura 20).



**Figura 20. Detección de la expresión por Western blot de las construcciones E6E7m fusionadas a SP y/o KDEL en pUMVC4a.** a) Se puede apreciar la presencia de la señal 25 kDa correspondientes para cada construcción usando anticuerpos anti-E7 y anti-E. Se utilizó  $\beta$ -actina como control de carga.

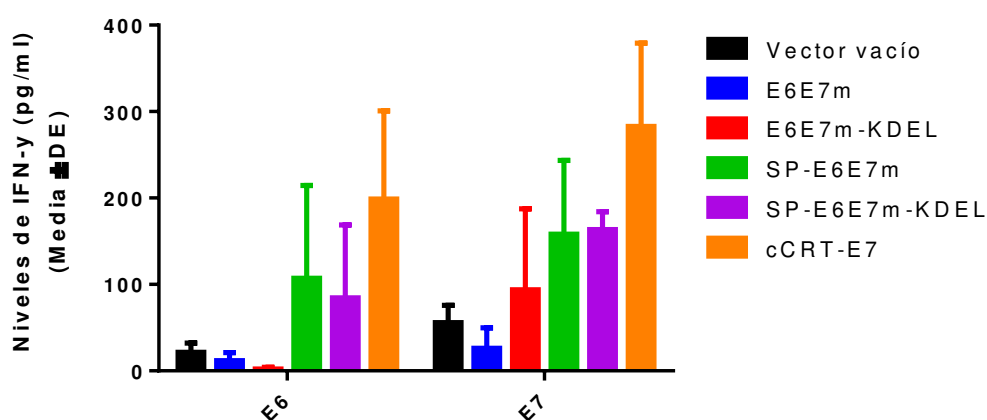
Posteriormente, se analizó la distribución celular del antígeno E6E7m al estar fusionado a SP y/o KDEL mediante microscopia confocal en células HEK-293 transfectadas. En este experimento se observó que en ausencia de SP (E6E7m y E6E7m-KDEL), la señal de fluorescencia para E7 se encuentra dentro de núcleo así como a lo largo del citoplasma, y no presenta colocalización con calnexina. En cambio, para las construcciones SP-E6E7m y SP-E6E7m-KDEL, la señal de E7 se detectó en retículo endoplásmico como se observa con la alta colocalización obtenida para con la señal de calnexina, concordando con nuestro control de referencia cCRT-E7 (Figura 21).



**Figura 21. Análisis por microscopía confocal de la distribución subcelular del antígeno E6E7m tras fusión a SP y/o KDEL.** Las células HEK-293 transfectadas con las distintas construcciones fueron procesadas para inmunofluorescencia utilizando anticuerpos anti-E7 y anti-calnexina con sus anticuerpos secundarios marcados con Alexa Fluor 594 (rojo) y 488 (verde), respectivamente, mientras que los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). La señal amarilla indica una colocalización entre las señales de los fluorocromos de los anticuerpos para E7 y calnexina. Imágenes tomadas al objetivo Plan-Apochromat 63x/1.40 Oil DIC M27.

### Son necesarias ambas señales (SP y KDEL) para obtener el máximo efecto antitumoral

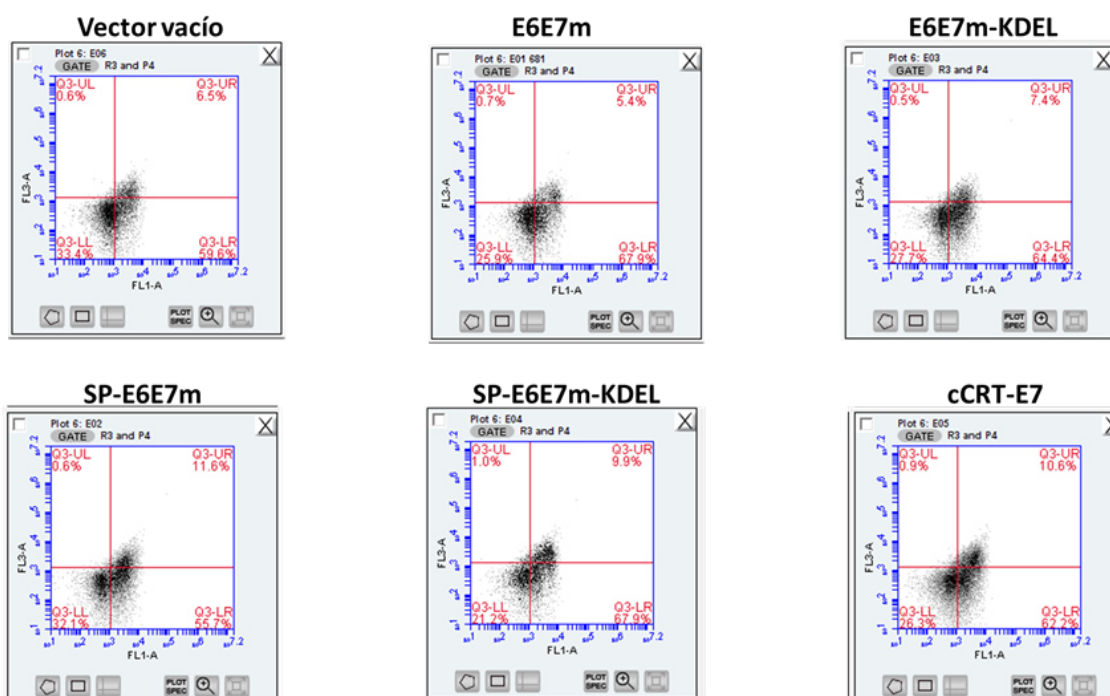
Para el análisis de la respuesta inmune específica al antígeno fusionado a SP y/o KDEL se procedió según lo descrito previamente. En el análisis de la producción de IFN- $\gamma$  se observó que no hay diferencia significativa entre la sensibilización por las construcciones de SP-E6E7m y SP-E6E7m-KDEL tanto para los epítomos de E6 y E7. También se detectó un aumento de sensibilización para E7 por el uso de KDEL, mientras que cCRT-E7 reportó un aumento considerable de IFN- $\gamma$  (Figura 22).



**Figura 22. Detección de IFN- $\gamma$  específico por ELISA de esplenocitos en respuesta a inmunización con E6E7m fusionado a SP y/o KDEL.** Los murinos recibieron 2 inmunizaciones por biobalística con 1  $\mu$ g de ADN en cada ocasión, posteriormente se colectaron esplenocitos y se incubaron bajo estimulación con el epítomo de E6 o E7, y se analizó la producción de IFN- $\gamma$  específico a las 48 horas por la técnica de ELISA.

Posteriormente, se decidió analizar si existía un aumento en la población de linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicos a E6 y E7 al cultivar los esplenocitos con estímulos de los epítomos de E6 y E7 por 48 horas. El marcaje se siguió en base a lo descrito en la metodología, donde después de la incubación con anti-CD3<sup>+</sup> (Alexa Fluor 488) y anti-CD8<sup>+</sup> (Alexa Fluor 594), las muestras fueron resuspendidas en buffer FACS y leídas por citometría.

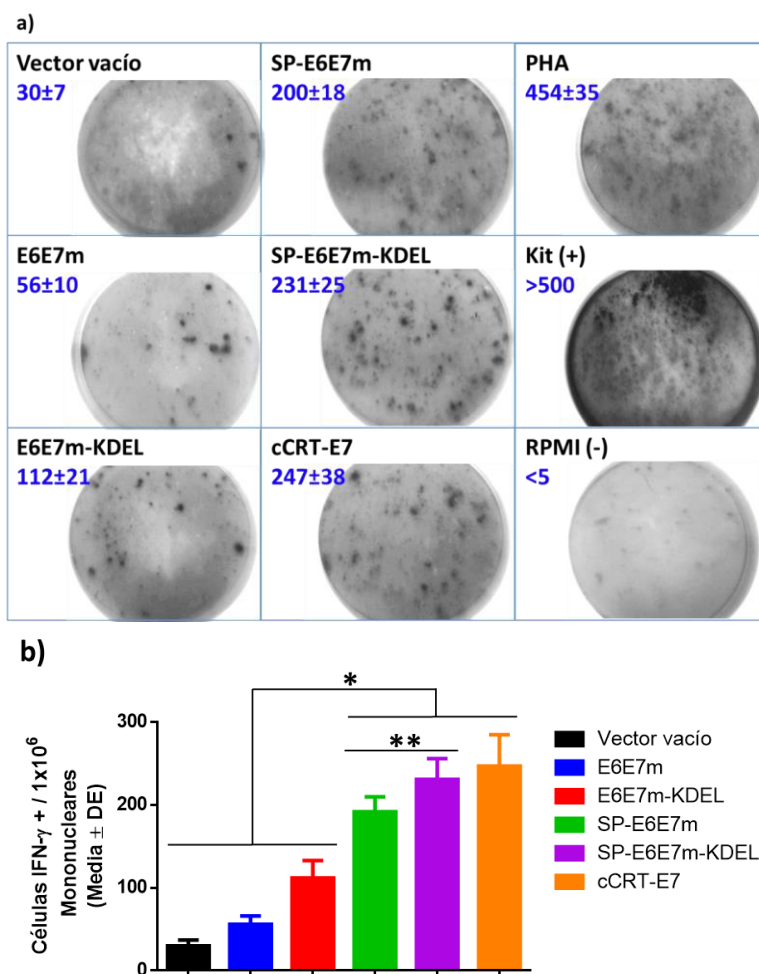
En los resultados se observó que existe un aumento en la población  $CD3^+/CD8^+$  (Figura 23, Cuadrante Q3) en las construcciones de SP-E6E7m, SP-E6E7m-KDEL, cCRT-E7 con respecto al resto de los tratamientos.



**Figura 23. Detección de población  $CD3^+/CD8^+$  en esplenocitos en respuesta a inmunización con E6E7m fusionado a SP y/o KDEL.** Los murinos recibieron 2 inmunizaciones por biobalística con 1  $\mu$ g de ADN en cada ocasión, posteriormente se colectaron esplenocitos y se incubaron bajo estimulación con el epítipo de E6 o E7, y se analizó la población  $CD3^+/CD8^+$  a las 48 horas por la citometría de flujo.

Los linfocitos T  $CD8^+$  al ser activados liberan  $IFN-\gamma$ , por lo que se decidió analizar la producción de dicha citocina a partir de un cultivo enriquecido de linfocitos. Para lo anterior, los esplenocitos fueron procesados por Ficoll-Paque (GE Health Care Systems) para obtener las células mononucleares y éstas fueron cultivadas con el epítipo para E7 en placa de ELISpot. A las 48 horas de cultivo se procesó la placa según lo descrito. El conteo de los spots se realizó a partir de las fotografías de cada pocillo con ayuda del Cell counter de ImageJ, esto con la finalidad de aumentar la resolución de las imágenes y poder discernir

fácilmente las señales positivas (Figura 24a). Los resultados indican que hay un aumento en el número de células productoras de IFN- $\gamma$  en SP-E6E7m-KDEL presentando una diferencia significativa ( $p<0.01$ ) con respecto a SP-E6E7m; sin embargo, las medias aritméticas son próximas entre ambos grupos. En cuanto a SP-E6E7m-KDEL y cCRT-E7 no se detectó una diferencia significativa entre ellos (Figura 24b).

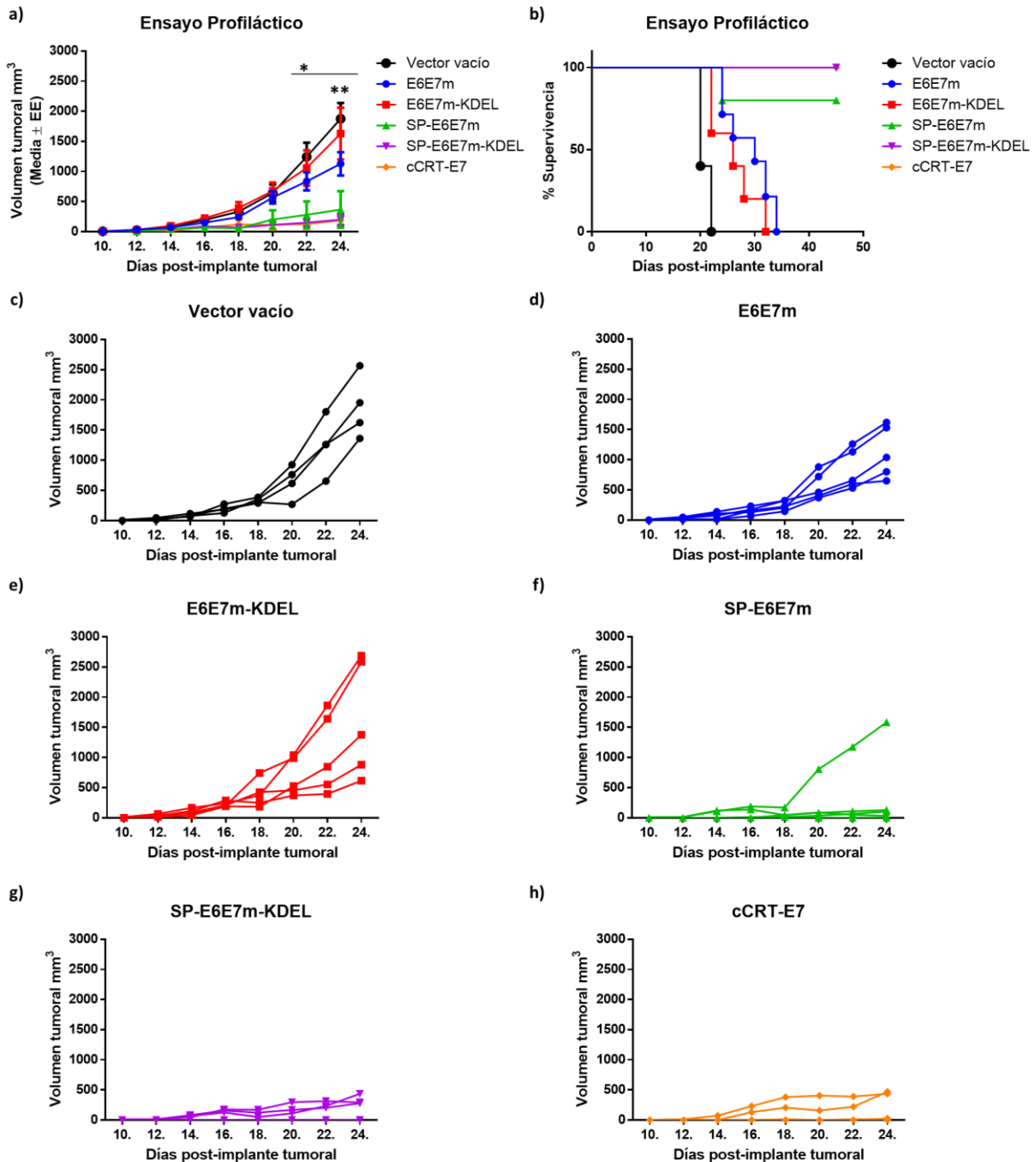


**Figura 24. Detección de IFN- $\gamma$  específico por ELISpot de mononucleares derivados de esplenocitos en respuesta a inmunización con E6E7m fusionado a SP y/o KDEL.** Se cultivaron las células mononucleares de los tratamientos en placas de ELISpot para IFN- $\gamma$  por 48 horas. a) Imagen de los spots para detección de liberación de IFN- $\gamma$  para cada tratamiento. b) Gráfica comparando las medias aritméticas del número de spots obtenidos para cada tratamiento. \* $p<0.05$ , SP-E6E7m, SP-E6E7m-KDEL y cCRT-E7 con respecto a E6E7m, E6E7m-KDEL y vector vacío, \*\*  $p<0.01$ , SP-E6E7m-KDEL con respecto SP-E6E7m.

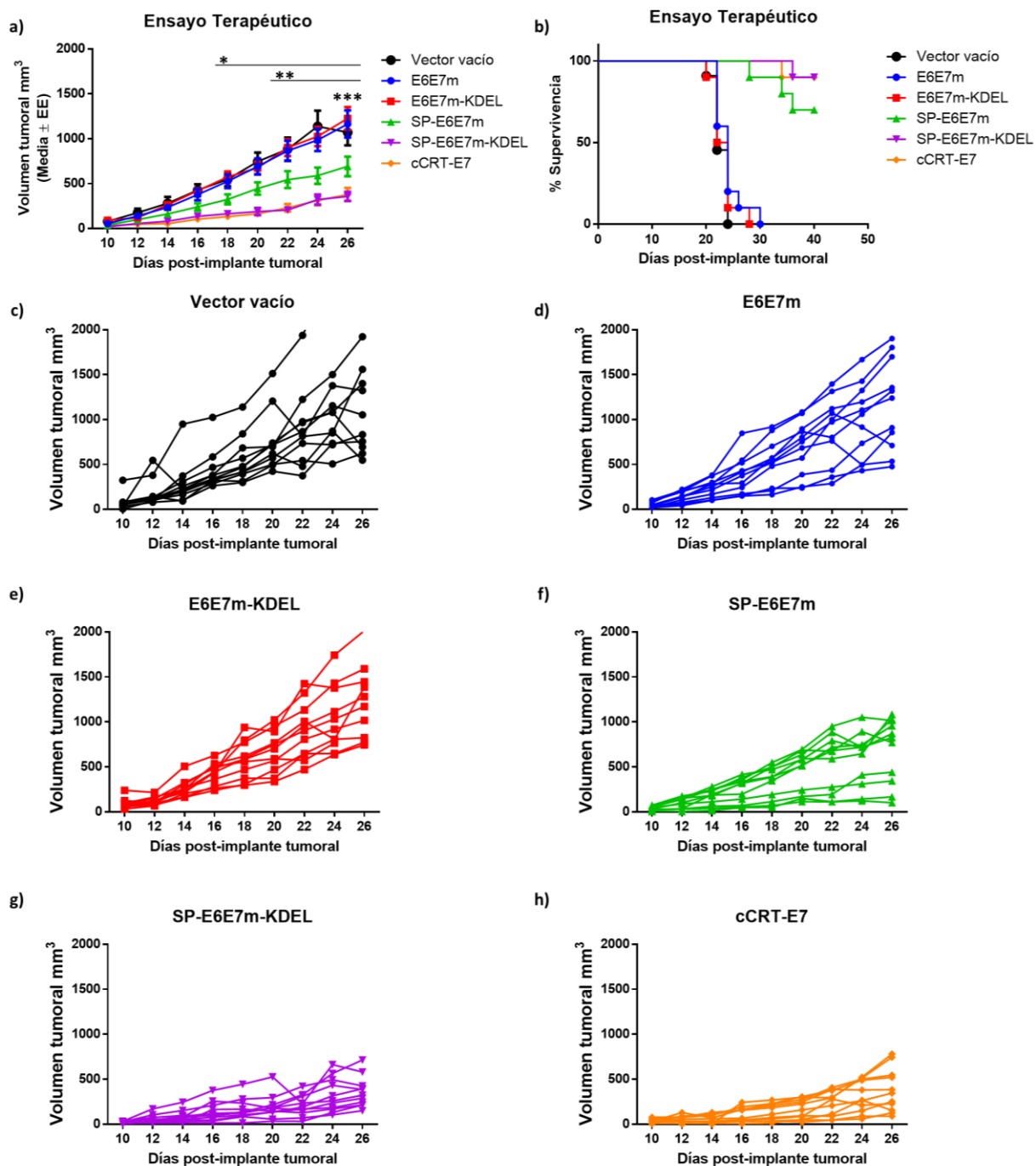
En la evaluación del efecto antitumoral profiláctico (Figura 25a) se observó que los grupos SP-E6E7m-KDEL y cCRT-E7 no presentan una diferencia significativa entre sí, pero que ambos si presentan una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) con respecto a E6E7m, E6E7m-KDEL y vector vacío a partir del día 18. Para el grupo SP-E6E7m, también se detectó una diferencia significativa contra E6E7m, E6E7m-KDEL y vector vacío; sin embargo, esto ocurrió a partir del día 22. Finalmente, en el análisis entre SP-E6E7m y SP-E6E7m-KDEL se observó que no existe diferencia significativa ( $p > 0.9999$ ) entre ellos a lo largo del ensayo, pero aun así al realizar la gráfica de supervivencia en base al volumen tumoral se observó un aumento de supervivencia por la inmunización con SP-E6E7m-KDEL (100%) con respecto a SP-E6E7m (80%) (Figura 25b).

Posteriormente, se decidió evaluar el efecto antitumoral terapéutico (Figura 26a) donde se obtuvo nuevamente que SP-E6E7m-KDEL y cCRT-E7 no se presentan una diferencia significativa entre ellos a lo largo del ensayo, y que para el día 18 ambos grupos presentaban una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) contra E6E7m, E6E7m-KDEL y vector vacío, mientras tanto, SP-E6E7m comenzó a reportar dicha diferencia ( $p < 0.05$ ) contra estos tres grupos hasta el día 22. Así también se detectó que SP-E6E7m presenta una mayor media aritmética con respecto SP-E6E7m-KDEL indicando que presenta un menor efecto antitumoral detectándose una diferencia significativa en el día 24 ( $p < 0.01$ ) así como el día 26 ( $p < 0.05$ ). Además, la inmunización con SP-E6E7m-KDEL (90%) produce una mayor supervivencia con respecto a la obtenida por SP-E6E7m (70%) (Figura 26b). En las figuras 25 y 26(c-h) se muestran los resultados individuales del volumen tumoral registrado para cada murino durante el transcurso del ensayo profiláctico y terapéutico, respectivamente.





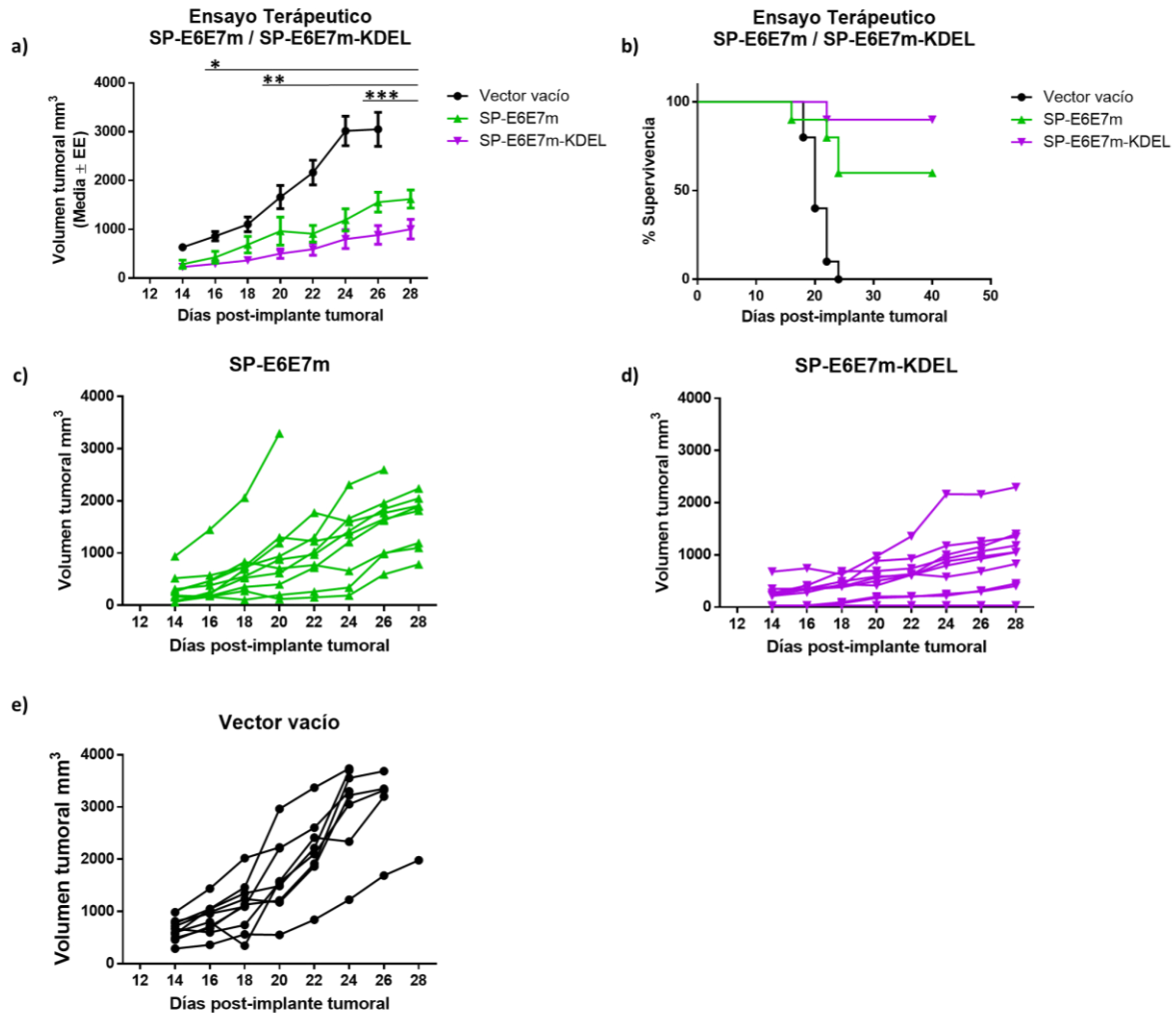
**Figura 25. Efecto antitumoral profiláctico por la inmunización con las construcciones de ADN del antígeno E6E7m fusionado a SP y/o KDEL.** Los murinos recibieron las inmunizaciones seguido del implante tumoral subcutáneo según lo descrito anteriormente. a) Gráfica tiempo de las medias tumorales para cada tratamiento. b) Gráfica de supervivencia, donde un volumen tumoral superior a 1 500 mm<sup>3</sup> es considerado como deceso. c-h) Gráfica de tiempo del volumen tumoral para cada murino de cada tratamiento. \* p<0.05, SP-E6E7m-KDEL y cCRT-E7 con respecto a E6E7m, E6E7m-KDEL y vector vacío, \*\* p<0.05, SP-E6E7m, SP-E6E7m-KDEL y cCRT-E7 con respecto a E6E7m, E6E7m-KDEL y vector vacío.



**Figura 26. Efecto antitumoral terapéutico por la inmunización con las construcciones de ADN del antígeno E6E7m fusionado a SP y/o KDEL.** Los murinos recibieron el implante tumoral subcutáneo seguido de las inmunizaciones según lo descrito anteriormente. a) Gráfica tiempo de las medias tumorales para cada tratamiento. b) Gráfica de supervivencia, donde un volumen tumoral superior a 1 500 mm<sup>3</sup> es considerado como deceso. c-h) Gráfica de tiempo del volumen tumoral para cada murino de cada tratamiento. \*  $p < 0.05$ , SP-E6E7m-KDEL y cCRT-E7 con respecto a E6E7m, E6E7m-KDEL y vector vacío, \*\*  $p < 0.05$ , SP-E6E7m, SP-E6E7m-KDEL y cCRT-E7 con respecto a E6E7m, E6E7m-KDEL y vector vacío \*\*\*  $p < 0.05$ , SP-E6E7m con respecto a SP-E6E7m-KDEL y cCRT-E7.

Para corroborar el efecto terapéutico, se repitió el ensayo evaluando únicamente SP-E6E7m contra SP-E6E7m-KDEL, y como control negativo se utilizó el vector vacío. Además, por esta ocasión se utilizaron murinos de 10-11 semanas de edad los cuales presentan una menor función inmunológica con respecto a los murinos de 6 semanas, esto fue con la finalidad de aumentar la probabilidad de detectar una diferencia significativa en la capacidad de generar un efecto antitumoral entre las construcciones. En la figura 27a podemos observar como a partir del día 16 se presentó una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre SP-E6E7m-KDEL con el control de vector vacío mientras que SP-E6E7m comenzó a presentarla ( $p < 0.05$ ) a partir del día 20, y que para ese día SP-E6E7m-KDEL había aumentado la diferencia significativa contra el vector vacío ( $p < 0.01$ ). Finalmente, fue a partir del día 26 donde se logró detectar que SP-E6E7m presentaba una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) con respecto a SP-E6E7m-KDEL siendo este último el que presentaba una menor media aritmética del volumen tumoral. Estos resultados significaron un aumento en la supervivencia por la inmunización con SP-E6E7m-KDEL (90%) con respecto a lo obtenido por SP-E6E7m (60%) (Figura 27b). En la figura 27 (c-e) se muestran los resultados individuales del volumen tumoral registrado para cada murino.

Los resultados anteriores nos indican que la inmunización con la construcción de SP-E6E7m-KDEL es capaz de generar una respuesta antitumoral terapéutica superior a la obtenida por SP-E6E7m, indicando que el uso de la señal KDEL para retención en retículo endoplásmico es capaz de mejorar la respuesta inmune contra los antígenos enviados a retículo endoplásmico.



**Figura 27. Efecto antitumoral por la inmunización con las construcciones SP-E6E7m y SP-E6E7m-KDEL.** Los murinos recibieron el implante tumoral subcutáneo seguido de las inmunizaciones según lo descrito anteriormente. a) Gráfica tiempo de las medias tumorales para cada tratamiento. b) Gráfica de supervivencia, donde un volumen tumoral superior a 1 500 mm<sup>3</sup> es considerado como deceso. c-e) Gráfica de tiempo del volumen tumoral para cada murino de cada tratamiento. \*  $p<0.05$ , SP-E6E7m-KDEL con respecto a vector vacío, \*\*  $p<0.05$ , SP-E6E7m, y  $p<0.01$  SP-E6E7m-KDEL con respecto a vector vacío \*\*\*  $p<0.05$ , SP-E6E7m con respecto a SP-E6E7m-KDEL.

## DISCUSIÓN

---

Actualmente los estudios en cáncer se enfocan en desarrollar estrategias adyuvantes capaces de amplificar la respuesta inmune específica contra las células tumorales, las cuales representan un verdadero reto debido a los múltiples mecanismos de evasión que han desarrollado. Una de las herramientas que tenido gran auge es el uso de terapia génica para el desarrollo de vacunas de ADN, las cuales consisten en clonar el gen del antígeno de interés en un plásmido para ser inyectado en el organismo para su expresión y ser reconocido por el sistema inmune. Además, como ventajas se puede mencionar que dichas vacunas no requieren cadena fría para su conservación, son de fabricación rápida y son fáciles de escalar a nivel industrial. Para la aplicación de las vacunas de ADN, el uso de la biobalística representa un sistema atractivo ya que se requiere menor cantidad de ADN en comparación a la inmunización directa con ADN desnudo, y ésta técnica es más eficiente ya que su aplicación en piel estimula las células dendríticas y macrófagos presentes, las cuales son células presentadoras de antígenos profesionales que participan activamente en la respuesta inmune específica.

Para mejorar respuesta inmune por la vacunación se han utilizado múltiples estrategias como lo es la vía de administración, adyuvantes químicos o biológicos, versiones modificadas de antígenos, etc. Como ya hemos descrito, una estrategia es enviar los antígenos a retículo endoplásmico bajo la premisa que esto favorecerá su presentación por MHC-I favoreciendo una respuesta inmune celular capaz de eliminar las células infectadas

y transformadas. Para enviar antígenos hacia el retículo se ha optado por fusionarlos a proteínas residentes de dicho orgánulo, una de las más utilizadas y efectivas es la chaperona calreticulina (Kim et al. 2004; Gomez-Gutierrez et al. 2007). Posteriormente, nuestro equipo de trabajo planteó el simplificar dicha estrategia a través de la fusión del antígeno E7 a las señales de envío y retención en retículo endoplasmico (SP y KDEL, respectivamente) obtenidas de la calreticulina, y mediante un ensayo antitumoral profiláctico se determinó que es igual de efectiva el uso de la fusión de E7 con calreticulina (cCRT-E7) (Loera-Arias et al. 2010).

En el presente trabajo se replanteo dicha estrategia bajo un sistema de vacunación con ADN así como el impacto de cada señal en el efecto antitumoral observado, por lo que inicialmente nos enfocamos en analizar si la estrategia propuesta funciona en dicho sistema mediante la comparación entre el uso hCRTE6E7m y SP-E6E7m-KDEL.

Con la finalidad de analizar si la respuesta inmune generada era capaz de eliminar tumores metastásicos establecidos se optó por utilizar un modelo de implante tumoral intravenoso descrito en múltiples ensayos (Cheng et al. 2001; Peng et al. 2005). Los resultados demostraron que SP-E6E7m-KDEL presenta una reducción similar en el número de focos tumorales en pulmón a lo obtenido con hCRT-E6E7m. En los cortes histológicos para los tratamientos SP-E6E7m-KDEL, hCRT-E6E7m y cCRT-E7 se observaron disrupciones en el acomodo de las células tumorales así como pequeñas lesiones en pulmones que han sido reportadas por Amine y colaboradores como posibles sitios de regresión tumoral (Amine et al. 2009). Además, se detectó un infiltrado celular en los tumores, el cual por

características morfológicas concuerdan a la descripción de leucocitos (principalmente linfocitos), sin embargo, esto se detectó también en el control negativo de tratamiento por lo que su presencia se atribuye como posible respuesta al implante tumoral, donde su presencia no indica una actividad antitumoral en proceso ya que muchos tumores a pesar de presentar infiltrado leucocitario hay un balance de respuesta Th2 que suprime la respuesta inmune celular (Yamamura et al. 1993; Becker et al. 2013). Debido a esto, será necesario analizar a futuro que poblaciones celulares se encuentran relacionadas a estos tumores y si dichas poblaciones cambian con los distintos tratamientos analizados.

Posteriormente decidimos evaluar el grado de participación de las señales SP y KDEL en el efecto antitumoral. Inicialmente validamos la expresión de cada construcción detectándose una disminución en la señal de detección para E6E7m de las construcciones carentes de SP (E6E7m y E6E7m-KDEL), dicho resultado fue reproducible en diversas ocasiones usando anti-E7 y anti-E6. Esto concuerda con lo reportado por Cheng y colaboradores, los cuales observaron que aquellas proteínas que permanecen en citoplasma están expuestas a una mayor probabilidad de degradación que aquellas que son enviadas al retículo endoplásmico (Cheng et al. 2001; Kim et al. 2004).

Al analizar por microscopia confocal la inmunofluorescencia de células transfectadas con las construcciones de SP y/o KDEL pudimos detectar que al momento de eliminarse SP provocó que la señal para el antígeno se distribuyese a lo largo del citoplasma y núcleo sin mostrar señal alguna de colocalización con calnexina. La razón por la presencia de señal positiva dentro del núcleo es debido a que el antígeno aún puede ser translocado al núcleo

por la presencia de señales para importinas en su secuencia (Tao et al. 2003); sin embargo, éste no presenta potencial oncogénico por las mutaciones puntuales insertadas. Mientras que la señal de detección obtenida para las construcciones SP-E6E7m-KDEL y SP-E6E7m colocalizaba en su totalidad con la señal para calnexina, indicando así que el antígeno se encuentra dentro del retículo endoplásmico. Los resultados anteriores se obtuvieron solamente usando anti-E7, mientras que usando anti-E6 se obtenía una baja o nula intensidad de la señal, inclusive trabajando a diversas concentraciones de los anticuerpos y con distintos protocolos de fijación celular, lo anterior posiblemente se deba a que el epítipo era sensible a daño y la unión del anticuerpo era mínima.

Con los resultados *in vitro*, detectamos la importancia de la señal SP, ya que su ausencia provocaba una menor presencia del antígeno en células transfectadas y que además se dispersaba a lo largo de la célula. En cambio, no lográbamos detectar el impacto de la ausencia de la señal KDEL, ya que no se logró detectar una diferencia en los niveles de expresión y distribución entre E6E7m y E6E7m-KDEL.

En el análisis de ELISA para la producción de IFN- $\gamma$  se detectó que hay un aumento en la producción por los esplenocitos del grupo SP-E6E7m y SP-E6E7m-KDEL sin detectarse una diferencia significativa; sin embargo, ambos son superados por el grupo cCRT-E7. Lo anterior se atribuye a que en esta ocasión se utilizó el vector pUMVC4a que presenta secuencias inmunoestimuladoras actuando sinérgicamente con los efectos inmunogénicos por la expresión de CRT (Cheng et al. 2001) y aumentando así la sensibilidad para el antígeno E7. Posteriormente, con los resultados de citometría de flujo se observó un aumento en la



población de linfocitos CD8<sup>+</sup> dentro los esplenocitos estimulados con antígeno E7. Por anterior, se decidió extraer las células mononucleares y analizar la producción específica a antígeno de IFN- $\gamma$ , debido a que estas células presentan un enriquecimiento de linfocitos, englobando así a las células efectoras y cooperadoras productoras de IFN- $\gamma$  que participan en la respuesta inmune celular específica a antígeno (Schoenborn and Wilson 2007). Para esto, se llevó a cabo un análisis de ELISPOT, el cual consiste en un sistema práctico para visualizar el número de células que liberan IFN- $\gamma$  que en comparación a la citometría de flujo, donde la detección intracelular de vesículas IFN- $\gamma$  no garantiza que estas fuesen a ser liberadas por los distintos mecanismos de regulación de la célula (Karlsson et al. 2003; Schoenborn and Wilson 2007). En los resultados observamos cómo SP-E6E7m-KDEL presenta una mayor producción IFN- $\gamma$  al compararse contra SP-E6E7m, indicando que se da una mayor sensibilización específica al antígeno al utilizar la señal KDEL en conjunto con SP. A pesar que en el análisis de IFN- $\gamma$  por ELISA y ELISPOT se observa que hay concordancia en los resultados obtenidos, se observa que los resultados obtenidos por ELISPOT presentan una mayor significancia estadística, esto podría deberse a que en dicho ensayo se utilizó una población más homogénea consistiendo solamente en mononucleares en los cuales predomina el estirpe linfoide, mientras que en los esplenocitos hay varias poblaciones que pudiesen dar variaciones en los resultados obtenidos. Por lo tanto, se sugiere continuar con repeticiones de dichos ensayos para asegurar su reproducibilidad.

En el ensayo in vivo se corrobora nuevamente que la inmunización utilizando la estrategia del envío y retención en retículo endoplásmico mediante la fusión del antígeno a las señales SP y KDEL (SP-E6E7m-KDEL) es capaz de generar un efecto antitumoral y que

es similar al reportado utilizando la fusión a calreticulina completa (cCRT-E7). Posteriormente, nos enfocamos en analizar el grado de participación de KDEL en dicha respuesta comparando SP-E6E7m-KDEL contra SP-E6E7m. Para lo anterior se decidió realizar un análisis de ANOVA de dos vías comparando la media del volumen tumoral de cada día entre todos los grupos y así poder detectar cuando comienza a generarse una diferencia significativa entre los diversos grupos. En el ensayo profiláctico no se logró detectar una diferencia significativa a lo largo del ensayo debiéndose a que la inmunización con antígenos enviados a retículo endoplásmico es capaz de generar una respuesta inmune específica, lo cual ya había sido reportado por otros autores (revisión en Kovjazin and Carmon 2014). Por lo tanto, al inmunizar con SP-E6E7m se generó una respuesta antitumoral capaz afectar el implante y crecimiento tumoral. Mientras tanto, en ambos ensayos terapéuticos se detectó una separación entre las medias aritméticas del volumen tumoral de SP-E6E7m-KDEL con respecto a SP-E6E7m, siendo el último el que presentaba un mayor volumen tumoral. Dicha diferencia entre las medias aritméticas fue progresando a lo largo del ensayo a tal medida que logró detectarse una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en las ultimas tomas de medida del ensayo. La razón por la que en esta ocasión se logró detectar una diferencia significativa se debe a que en el ensayo terapéutico se presenta el crecimiento activo del tumor, por lo que la velocidad y eficiencia de la generación de la respuesta inmune de las distintas vacunas es esencial, resultando que SP-E6E7m-KDEL es capaz de generar un efecto antitumoral eficiente capaz de retardar el crecimiento tumoral en mayor medida en comparación con SP-E6E7m.

Por lo tanto, se detectó que SP-E6E7m es capaz de despertar una respuesta inmune

antitumoral implicando que el enviar el antígeno a retículo endoplásmico aumenta la respuesta inmune antitumoral y específica a antígeno, lo cual ya ha sido descrito y revisado por otros autores (Kovjazin and Carmon 2014). Sin embargo, nuestros resultados indican que dicha respuesta puede ser mejorada significativamente al añadirle la señal KDEL en su extremo carboxilo terminal. En conclusión, es necesario la fusión del antígeno a las señales SP y KDEL en conjunto para obtener la respuesta inmune antitumoral que es igual de efectiva al uso de fusión con calreticulina que hemos descrito previamente (Loera-Arias et al. 2010, Perez-Trujillo et al. 2016), y que han sido nuevamente corroborados en el presente trabajo.

La aportación de este trabajo es el generar un conocimiento referente a estrategias que potencien la respuesta inmune antitumoral y específica a antígeno a través de la generación de mecanismos adyuvantes basados en la mejora del procesamiento de antígeno. Nuestro grupo de trabajo se enfoca en conseguir dicho objetivo a través del envío y retención de antígenos a retículo endoplásmico, que a pesar que el trabajo se desarrolle usando un modelo de cáncer por VPH, se espera que dicha estrategia pueda ser aplicada a diversos antígenos con la finalidad de aumentar su inmunogenicidad y mejorar la respuesta inmune específica del organismo para la generación de terapias en otros padecimientos.

## CONCLUSIONES

---

- La estrategia de envío y retención de antígenos en retículo endoplásmico es eficaz para generar una respuesta inmune específica en un esquema de vacunas de ADN.
- La inmunización con la fusión del antígeno E6E7m a SP y KDEL es capaz de generar un efecto antitumoral similar a la fusión a calreticulina completa.
- El diseño de nuestra señal de envío a RE (SP) promueve un envío eficiente del antígeno en retículo endoplásmico.
- Es necesario el uso de la señal de retención (KDEL) en el antígeno E6E7m enviado a retículo endoplásmico para obtener el máximo efecto antitumoral.

## **APORTACIONES**

---

- En este trabajo se reporta por primera vez la respuesta antitumoral generada por la inmunización con vacunas de ADN codificantes para E6E7m fusionados a SP y KDEL para el envío y de retención de antígenos en retículo endoplásmico.
- Se determinó que es necesaria la retención del antígeno E6E7m en retículo endoplásmico para obtener el máximo efecto antitumoral.

## PERSPECTIVAS

---

- Evaluación del uso de las señales SP y KDEL con otros antígenos de otros padecimientos.
- Estudiar los mecanismos responsables de la mejora del efecto antitumoral.
- Evaluar con el uso adyuvantes quimioatrayentes durante la inmunización para mejorar la respuesta inmune.

## REFERENCIAS

---

- Amador-Molina, Alfredo, José Fernando Hernández-Valencia, Edmundo Lamoyi, Adriana Contreras-Paredes, and Marcela Lizano. 2013. "Role of Innate Immunity against Human Papillomavirus (HPV) Infections and Effect of Adjuvants in Promoting Specific Immune Response." *Viruses* 5 (11): 2624–42. doi:10.3390/v5112624.
- Amine, Abdessamad, Sofia Rivera, Paule Opolon, Mehdi Dekkal, Denis S. F. Biard, Hakim Bouamar, Fawzia Louache, et al. 2009. "Novel Anti-Metastatic Action of Cidofovir Mediated by Inhibition of E6/E7, CXCR4 and Rho/ROCK Signaling in HPV Tumor Cells." *PloS One* 4 (3): e5018. doi:10.1371/journal.pone.0005018.
- Anderson, K., P. Cresswell, M. Gammon, J. Hermes, A. Williamson, and H. Zweerink. 1991. "Endogenously Synthesized Peptide with an Endoplasmic Reticulum Signal Sequence Sensitizes Antigen Processing Mutant Cells to Class I-Restricted Cell-Mediated Lysis." *The Journal of Experimental Medicine* 174 (2): 489–92.
- Azevedo, V., G. Levitus, A. Miyoshi, A. L. Cândido, A. M. Goes, and S. C. Oliveira. 1999. "Main Features of DNA-Based Immunization Vectors." *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 32 (2). doi:10.1590/S0100-879X1999000200002.
- Baseman, Janet G., and Laura A. Koutsky. 2005. "The Epidemiology of Human Papillomavirus Infections." *Journal of Clinical Virology* 32 (March): 16–24. doi:10.1016/j.jcv.2004.12.008.
- Becker, Jürgen C., Mads Hald Andersen, David Schrama, and Per thor Straten. 2013. "Immune-Suppressive Properties of the Tumor Microenvironment." *Cancer Immunology, Immunotherapy* 62 (7): 1137–48. doi:10.1007/s00262-013-1434-6.

- Bellanger, Sophie, Chye Ling Tan, Yue Zhen Xue, Sébastien Teissier, and Françoise Thierry. 2011. "Tumor Suppressor or Oncogene? A Critical Role of the Human Papillomavirus (HPV) E2 Protein in Cervical Cancer Progression." *American Journal of Cancer Research* 1 (3): 373–89.
- Bernard, Hans-Ulrich, Robert D. Burk, Zigui Chen, Koenraad van Doorslaer, Harald zur Hausen, and Ethel-Michele de Villiers. 2010. "Classification of Papillomaviruses (PVs) Based on 189 PV Types and Proposal of Taxonomic Amendments." *Virology* 401 (1): 70–79. doi:10.1016/j.virol.2010.02.002.
- Boshart, M, L Gissmann, H Ikenberg, A Kleinheinz, W Scheurlen, and H zur Hausen. 1984. "A New Type of Papillomavirus DNA, Its Presence in Genital Cancer Biopsies and in Cell Lines Derived from Cervical Cancer." *The EMBO Journal* 3 (5): 1151–57.
- Boyer, S. N., D. E. Wazer, and V. Band. 1996. "E7 Protein of Human Papilloma Virus-16 Induces Degradation of Retinoblastoma Protein through the Ubiquitin-Proteasome Pathway." *Cancer Research* 56 (20): 4620–24.
- Cheng, W. F., C. F. Hung, C. Y. Chai, K. F. Hsu, L. He, M. Ling, and T. C. Wu. 2001. "Tumor-Specific Immunity and Antiangiogenesis Generated by a DNA Vaccine Encoding Calreticulin Linked to a Tumor Antigen." *The Journal of Clinical Investigation* 108 (5): 669–78. doi:10.1172/JCI12346.
- Cheng, W. F., C. F. Hung, K. Y. Lin, M. Ling, J. Juang, L. He, C. T. Lin, and T.-C. Wu. 2003. "CD8+ T Cells, NK Cells and IFN- $\gamma$  Are Important for Control of Tumor with Downregulated MHC Class I Expression by DNA Vaccination." *Gene Therapy* 10 (16): 1311–20. doi:10.1038/sj.gt.3301982.
- Chen, Shaochun, Chaowei Liao, Yiukay Lai, Yan Fan, Gang Lu, Hua Wang, Xiaoi Zhang, Marie C. M. Lin, Shuiling Leng, and Hsiang-Fu Kung. 2014. "De-Oncogenic HPV E6/E7 Vaccine Gets



- Enhanced Antigenicity and Promotes Tumoricidal Synergy with Cisplatin.” *Acta Biochimica Et Biophysica Sinica* 46 (1): 6–14. doi:10.1093/abbs/gmt121.
- Dalal, S., Q. Gao, E. J. Androphy, and V. Band. 1996. “Mutational Analysis of Human Papillomavirus Type 16 E6 Demonstrates That p53 Degradation Is Necessary for Immortalization of Mammary Epithelial Cells.” *Journal of Virology* 70 (2): 683–88.
- Demeret, C, C Desaintes, M Yaniv, and F Thierry. 1997. “Different Mechanisms Contribute to the E2-Mediated Transcriptional Repression of Human Papillomavirus Type 18 Viral Oncogenes.” *Journal of Virology* 71 (12): 9343–49.
- Draper, Eve, Sara L. Bissett, Rebecca Howell-Jones, Pauline Waight, Kate Soldan, Mark Jit, Nicholas Andrews, Elizabeth Miller, and Simon Beddows. 2013. “A Randomized, Observer-Blinded Immunogenicity Trial of Cervarix® and Gardasil® Human Papillomavirus Vaccines in 12-15 Year Old Girls.” *PLoS ONE* 8 (5). doi:10.1371/journal.pone.0061825.
- Duensing, S., L. Y. Lee, A. Duensing, J. Basile, S. Piboonniyom, S. Gonzalez, C. P. Crum, and K. Munger. 2000. “The Human Papillomavirus Type 16 E6 and E7 Oncoproteins Cooperate to Induce Mitotic Defects and Genomic Instability by Uncoupling Centrosome Duplication from the Cell Division Cycle.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (18): 10002–7. doi:10.1073/pnas.170093297.
- Dürst, M., L. Gissmann, H. Ikenberg, and H. zur Hausen. 1983. “A Papillomavirus DNA from a Cervical Carcinoma and Its Prevalence in Cancer Biopsy Samples from Different Geographic Regions.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80 (12): 3812–15.
- Egawa, Nagayasu, Kiyofumi Egawa, Heather Griffin, and John Doorbar. 2015. “Human Papillomaviruses; Epithelial Tropisms, and the Development of Neoplasia.” *Viruses* 7 (7): 3863–90. doi:10.3390/v7072802.

- Eggleton, P., and D. H. Llewellyn. 1999. "Pathophysiological Roles of Calreticulin in Autoimmune Disease." *Scandinavian Journal of Immunology* 49 (5): 466–73.
- Elbel, M., S. Carl, S. Spaderna, and T. Iftner. 1997. "A Comparative Analysis of the Interactions of the E6 Proteins from Cutaneous and Genital Papillomaviruses with p53 and E6AP in Correlation to Their Transforming Potential." *Virology* 239 (1): 132–49. doi:10.1006/viro.1997.8860.
- Ferraro, Bernadette, Matthew P. Morrow, Natalie A. Hutnick, Thomas H. Shin, Colleen E. Lucke, and David B. Weiner. 2011. "Clinical Applications of DNA Vaccines: Current Progress." *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 53 (3): 296–302. doi:10.1093/cid/cir334.
- Garland, Suzanne M. 2015. "Genital and Extra-Genital Infections: Update on HPV." *Pathology, Australasian Division of the International Academy of Pathology Abstracts 39th Annual Scientific Meeting 2014*, 47 (January): S49. doi:10.1097/01.PAT.0000461452.88784.c5.
- Garmory, Helen S., Katherine A. Brown, and Richard W. Titball. 2003. "DNA Vaccines: Improving Expression of Antigens." *Genetic Vaccines and Therapy* 1: 2. doi:10.1186/1479-0556-1-2.
- Gelebart, Pascal, Michal Opas, and Marek Michalak. 2005. "Calreticulin, a Ca<sup>2+</sup>-Binding Chaperone of the Endoplasmic Reticulum." *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 37 (2): 260–66. doi:10.1016/j.biocel.2004.02.030.
- Ghanem, Ashraf, Robert Healey, and Frady G. Adly. 2013. "Current Trends in Separation of Plasmid DNA Vaccines: A Review." *Analytica Chimica Acta* 760 (January): 1–15. doi:10.1016/j.aca.2012.11.006.
- Gomez-Gutierrez, Jorge G., Kutlu G. Elpek, Roberto Montes de Oca-Luna, Haval Shirwan, H. Sam Zhou, and Kelly M. McMasters. 2007. "Vaccination with an Adenoviral Vector Expressing Calreticulin-Human Papillomavirus 16 E7 Fusion Protein Eradicates E7 Expressing

- Established Tumors in Mice.” *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII* 56 (7): 997–1007.  
doi:10.1007/s00262-006-0247-2.
- Han, R., N. M. Cladel, C. A. Reed, and N. D. Christensen. 1998. “Characterization of Transformation Function of Cottontail Rabbit Papillomavirus E5 and E8 Genes.” *Virology* 251 (2): 253–63.  
doi:10.1006/viro.1998.9416.
- Holoshitz, Joseph, Denise E. De Almeida, and Song Ling. 2010. “A Role for Calreticulin in the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis.” *Annals of the New York Academy of Sciences* 1209 (October): 91–98. doi:10.1111/j.1749-6632.2010.05745.x.
- Ibraheem, D., A. Elaissari, and H. Fessi. 2014. “Gene Therapy and DNA Delivery Systems.” *International Journal of Pharmaceutics* 459 (1–2): 70–83.  
doi:10.1016/j.ijpharm.2013.11.041.
- Jemal, Ahmedin, Freddie Bray, Melissa M. Center, Jacques Ferlay, Elizabeth Ward, and David Forman. 2011. “Global Cancer Statistics.” *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 61 (2): 69–90.  
doi:10.3322/caac.20107.
- Kanda, T., S. Watanabe, S. Zanma, H. Sato, A. Furuno, and K. Yoshiike. 1991. “Human Papillomavirus Type 16 E6 Proteins with Glycine Substitution for Cysteine in the Metal-Binding Motif.” *Virology* 185 (2): 536–43.
- Kanodia, Shreya, Laura M. Fahey, and W. Martin Kast. 2007. “Mechanisms Used by Human Papillomaviruses to Escape the Host Immune Response.” *Current Cancer Drug Targets* 7 (1): 79–89.
- Karlsson, Annika C., Jeffrey N. Martin, Sophie R. Younger, Barry M. Bredt, Lorrie Epling, Rollie Ronquillo, Arjun Varma, et al. 2003. “Comparison of the ELISPOT and Cytokine Flow Cytometry Assays for the Enumeration of Antigen-Specific T Cells.” *Journal of Immunological Methods* 283 (1-2): 141–53.

- Kim, J. W., C.-F. Hung, J. Juang, L. He, T. Woo Kim, D. K. Armstrong, S. I. Pai, et al. 2004. "Comparison of HPV DNA Vaccines Employing Intracellular Targeting Strategies." *Gene Therapy* 11 (12): 1011–18. doi:10.1038/sj.gt.3302252.
- Kovjazin, Riva, and Lior Carmon. 2014. "The Use of Signal Peptide Domains as Vaccine Candidates." *Human Vaccines & Immunotherapeutics* 10 (9): 2733–40. doi:10.4161/21645515.2014.970916.
- Lange, Christian E, Claude Favrot, Mathias Ackermann, Jessica Gull, Elisabeth Vetsch, and Kurt Tobler. 2011. "Novel Snake Papillomavirus Does Not Cluster with Other Non-Mammalian Papillomaviruses." *Virology Journal* 8 (September): 436. doi:10.1186/1743-422X-8-436.
- Lehtinen, M., I. Rantala, A. Toivonen, H. Luoto, R. Aine, K. Lauslahti, A. Ylä-Outinen, U. Romppanen, and J. Paavonen. 1993. "Depletion of Langerhans Cells in Cervical HPV Infection Is Associated with Replication of the Virus." *APMIS: Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica* 101 (11): 833–37.
- Leifert, Jens A., Maria P. Rodriguez-Carreno, Fernando Rodriguez, and J. Lindsay Whitton. 2004. "Targeting Plasmid-Encoded Proteins to the Antigen Presentation Pathways." *Immunological Reviews* 199 (June): 40–53. doi:10.1111/j.0105-2896.2004.0135.x.
- Lin, K. Y., F. G. Guarnieri, K. F. Staveley-O'Carroll, H. I. Levitsky, J. T. August, D. M. Pardoll, and T. C. Wu. 1996. "Treatment of Established Tumors with a Novel Vaccine That Enhances Major Histocompatibility Class II Presentation of Tumor Antigen." *Cancer Research* 56 (1): 21–26.
- Li, Yan-Li, Xu-Hua Qiu, Chen Shen, Jian-Ning Liu, and Jing Zhang. 2010. "Vaccination of Full-Length HPV16 E6 or E7 Protein Inhibits the Growth of HPV16 Associated Tumors." *Oncology Reports* 24 (5): 1323–29.
- Loera-Arias, M. J., A. G. Martínez-Pérez, A. Barrera-Hernández, E. R. Ibarra-Obregón, G. González-Saldívar, J. I. Martínez-Ortega, A. Rosas-Taraco, et al. 2010. "Targeting and Retention of

- HPV16 E7 to the Endoplasmic Reticulum Enhances Immune Tumour Protection." *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 14 (4): 890–94. doi:10.1111/j.1582-4934.2009.00934.x.
- Malejczyk, Jacek, Slawomir Majewski, and Stefania Jabłońska. 1997. "Cellular Immunity in Cutaneous and Genital HPV Infections." *Clinics in Dermatology, Papillomaviruses: Part One*, 15 (2): 261–74. doi:10.1016/S0738-081X(97)00049-7.
- Malejczyk, Jacek, Slawomir Majewski, Stefania Jablonska, Tomasz T. Rogozinski, and Gerard Orth. 1989. "Abrogated NK-Cell Lysis of Human Papillomavirus (HPV)-16-Bearing Keratinocytes in Patients with Pre-Cancerous and Cancerous HPV-Induced Anogenital Lesions." *International Journal of Cancer* 43 (2): 209–14. doi:10.1002/ijc.2910430206.
- Mantovani, F., and L. Banks. 2001. "The Human Papillomavirus E6 Protein and Its Contribution to Malignant Progression." *Oncogene* 20 (54): 7874–87. doi:10.1038/sj.onc.1204869.
- Miura, Shiho, Kei Kawana, Danny J. Schust, Tomoyuki Fujii, Terufumi Yokoyama, Yuki Iwasawa, Takeshi Nagamatsu, et al. 2010. "CD1d, a Sentinel Molecule Bridging Innate and Adaptive Immunity, Is Downregulated by the Human Papillomavirus (HPV) E5 Protein: A Possible Mechanism for Immune Evasion by HPV." *Journal of Virology* 84 (22): 11614–23. doi:10.1128/JVI.01053-10.
- Ms, Barbosa, and Schlegel R. 1989. "The E6 and E7 Genes of HPV-18 Are Sufficient for Inducing Two-Stage in Vitro Transformation of Human Keratinocytes." *Oncogene* 4 (12): 1529–32.
- Münger, Karl, Amy Baldwin, Kirsten M. Edwards, Hiroyuki Hayakawa, Christine L. Nguyen, Michael Owens, Miranda Grace, and KyungWon Huh. 2004. "Mechanisms of Human Papillomavirus-Induced Oncogenesis." *Journal of Virology* 78 (21): 11451–60. doi:10.1128/JVI.78.21.11451-11460.2004.

- Neefjes, Jacques, Marlieke L. M. Jongsma, Petra Paul, and Oddmund Bakke. 2011. "Towards a Systems Understanding of MHC Class I and MHC Class II Antigen Presentation." *Nature Reviews Immunology* 11 (12): 823–36. doi:10.1038/nri3084.
- "Oncogenic Activity of HPV Genes << Group for Cancer Development and Progression Division of Virology << National Cancer Center Research Institute." 2016. Accessed October 5. <http://www.nccri.ncc.go.jp/en/divisions/10vir/10vir01.html>.
- Orange, Jordan S. 2002. "Human Natural Killer Cell Deficiencies and Susceptibility to Infection." *Microbes and Infection* 4 (15): 1545–58. doi:10.1016/S1286-4579(02)00038-2.
- Pardoll, Drew M, and Suzanne L Topalian. 1998. "The Role of CD4+ T Cell Responses in Antitumor Immunity." *Current Opinion in Immunology* 10 (5): 588–94. doi:10.1016/S0952-7915(98)80228-8.
- Peiretti, M., I. Zapardiel, V. Zanagnolo, F. Landoni, C. P. Morrow, and A. Maggioni. 2012. "Management of Recurrent Cervical Cancer: A Review of the Literature." *Surgical Oncology* 21 (2): e59–66. doi:10.1016/j.suronc.2011.12.008.
- Peng, Shiwen, Cornelia Trimble, Hongxiu Ji, Liangmei He, Ya-Chea Tsai, Bruno Macaes, Chien-Fu Hung, and T.-C. Wu. 2005. "Characterization of HPV-16 E6 DNA Vaccines Employing Intracellular Targeting and Intercellular Spreading Strategies." *Journal of Biomedical Science* 12 (5): 689–700. doi:10.1007/s11373-005-9012-3.
- Petignat, Patrick, and Michel Roy. 2007. "Diagnosis and Management of Cervical Cancer." *BMJ* 335 (7623): 765–68. doi:10.1136/bmj.39337.615197.80.
- Roche, Paul A., and Kazuyuki Furuta. 2015. "The Ins and Outs of MHC Class II-Mediated Antigen Processing and Presentation." *Nature Reviews Immunology* 15 (4): 203–16. doi:10.1038/nri3818.

- Sato, Y., M. Roman, H. Tighe, D. Lee, M. Corr, M. D. Nguyen, G. J. Silverman, M. Lotz, D. A. Carson, and E. Raz. 1996. "Immunostimulatory DNA Sequences Necessary for Effective Intradermal Gene Immunization." *Science (New York, N.Y.)* 273 (5273): 352–54.
- Schiller, John T., Xavier Castellsagué, and Suzanne M. Garland. 2012. "A Review of Clinical Trials of Human Papillomavirus Prophylactic Vaccines." *Vaccine* 30 (0 5): F123–38. doi:10.1016/j.vaccine.2012.04.108.
- Schoenborn, Jamie R., and Christopher B. Wilson. 2007. "Regulation of Interferon-Gamma during Innate and Adaptive Immune Responses." *Advances in Immunology* 96: 41–101. doi:10.1016/S0065-2776(07)96002-2.
- Shi, Feng, Li Shang, Bei-Qing Pan, Xiao-Min Wang, Yan-Yi Jiang, Jia-Jie Hao, Yu Zhang, et al. 2014. "Calreticulin Promotes Migration and Invasion of Esophageal Cancer Cells by Upregulating Neuropilin-1 Expression via STAT5A." *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 20 (23): 6153–62. doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-0583.
- Shillitoe, E. J. 2006. "Papillomaviruses as Targets for Cancer Gene Therapy." *Cancer Gene Therapy* 13 (5): 445–50. doi:10.1038/sj.cgt.7700926.
- Shi, W., P. Bu, J. Liu, A. Polack, S. Fisher, and L. Qiao. 1999. "Human Papillomavirus Type 16 E7 DNA Vaccine: Mutation in the Open Reading Frame of E7 Enhances Specific Cytotoxic T-Lymphocyte Induction and Antitumor Activity." *Journal of Virology* 73 (9): 7877–81.
- Sönnichsen, B., J. Füllekrug, P. Nguyen Van, W. Diekmann, D. G. Robinson, and G. Mieskes. 1994. "Retention and Retrieval: Both Mechanisms Cooperate to Maintain Calreticulin in the Endoplasmic Reticulum." *Journal of Cell Science* 107 ( Pt 10) (October): 2705–17.
- Sontheimer, Richard D., Doina Racila, Emil Racila, Paul Eggleton, and Suzanne Donnelly. 2003. "Calreticulin's Role(s) in Autoimmune Disorders." In *Calreticulin*, edited by Paul Eggleton

- and Marek Michalak, 180–92. Molecular Biology Intelligence Unit. Springer US.  
[http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4419-9258-1\\_17](http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4419-9258-1_17).
- Stanley, Margaret. 2010. "HPV - Immune Response to Infection and Vaccination." *Infectious Agents and Cancer* 5 (October): 19. doi:10.1186/1750-9378-5-19.
- Stanley, Margaret A. 2012. "Epithelial Cell Responses to Infection with Human Papillomavirus." *Clinical Microbiology Reviews* 25 (2): 215–22. doi:10.1128/CMR.05028-11.
- Steele, Jane C., Sally Roberts, Susan M. Rookes, and Phillip H. Gallimore. 2002. "Detection of CD4+- and CD8+-T-Cell Responses to Human Papillomavirus Type 1 Antigens Expressed at Various Stages of the Virus Life Cycle by Using an Enzyme-Linked Immunospot Assay of Gamma Interferon Release." *Journal of Virology* 76 (12): 6027–36. doi:10.1128/JVI.76.12.6027-6036.2002.
- Tao, Mingfang, Michael Kruhlak, Shuhua Xia, Elliot Androphy, and Zhi-Ming Zheng. 2003. "Signals That Dictate Nuclear Localization of Human Papillomavirus Type 16 Oncoprotein E6 in Living Cells." *Journal of Virology* 77 (24): 13232–47.
- Walboomers, J. M., M. V. Jacobs, M. M. Manos, F. X. Bosch, J. A. Kummer, K. V. Shah, P. J. Snijders, J. Peto, C. J. Meijer, and N. Muñoz. 1999. "Human Papillomavirus Is a Necessary Cause of Invasive Cervical Cancer Worldwide." *The Journal of Pathology* 189 (1): 12–19. doi:10.1002/(SICI)1096-9896(199909)189:1<12::AID-PATH431>3.0.CO;2-F.
- Wang, Li, Yu-zhang Wu, An Chen, Jing-bo Zhang, Zhao Yang, Wei Niu, Miao Geng, et al. 2004. "MHC Class I-Associated Presentation of Exogenous Peptides Is Not Only Enhanced but Also Prolonged by Linking with a C-Terminal Lys-Asp-Glu-Leu Endoplasmic Reticulum Retrieval Signal." *European Journal of Immunology* 34 (12): 3582–94. doi:10.1002/eji.200425215.



- Wazer, D. E., X. L. Liu, Q. Chu, Q. Gao, and V. Band. 1995. "Immortalization of Distinct Human Mammary Epithelial Cell Types by Human Papilloma Virus 16 E6 or E7." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92 (9): 3687–91. doi:10.1073/pnas.92.9.3687.
- Wieking, B. G., D. W. Vermeer, W. C. Spanos, K. M. Lee, P. Vermeer, W. T. Lee, Y. Xu, et al. 2012. "A Non-Oncogenic HPV 16 E6/E7 Vaccine Enhances Treatment of HPV Expressing Tumors." *Cancer Gene Therapy* 19 (10): 667–74. doi:10.1038/cgt.2012.55.
- Yamamura, M, R L Modlin, J D Ohmen, and R L Moy. 1993. "Local Expression of Antiinflammatory Cytokines in Cancer." *Journal of Clinical Investigation* 91 (3): 1005–10.
- Yang, Andrew, Jessica Jeang, Kevin Cheng, Ting Cheng, Benjamin Yang, T.-C. Wu, and Chien-Fu Hung. 2016. "Current State in the Development of Candidate Therapeutic HPV Vaccines." *Expert Review of Vaccines* 15 (8): 989–1007. doi:10.1586/14760584.2016.1157477.
- Yewdell, J. W. 2001. "Not Such a Dismal Science: The Economics of Protein Synthesis, Folding, Degradation and Antigen Processing." *Trends in Cell Biology* 11 (7): 294–97.
- Zamanian, Mohammadreza, Lama Abdel Qader Hamadne, Abhi Veerakumarasivam, Sabariah Abdul Rahman, Shamarina Shohaimi, and Rozita Rosli. 2016. "Calreticulin Mediates an Invasive Breast Cancer Phenotype through the Transcriptional Dysregulation of p53 and MAPK Pathways." *Cancer Cell International* 16: 56. doi:10.1186/s12935-016-0329-y.
- Zamanian, Mohammadreza, Abhi Veerakumarasivam, Syahril Abdullah, and Rozita Rosli. 2013. "Calreticulin and Cancer." *Pathology & Oncology Research* 19 (2): 149–54. doi:10.1007/s12253-012-9600-2.
- Zheng, Zhi-Ming, and Carl C. Baker. 2006. "PAPILLOMAVIRUS GENOME STRUCTURE, EXPRESSION, AND POST-TRANSCRIPTIONAL REGULATION." *Frontiers in Bioscience : A Journal and Virtual Library* 11 (September): 2286–2302.

## **APÉNDICE**

Curriculum vitae

Artículos publicados

## ► José Juan Pérez Trujillo

Correo electrónico: jjperez86@gmail.com  
Fecha de Nacimiento: 28-Septiembre-1986



### ❖ Formación Académica:

2012 – 2016	Doctorado con acentuación en Morfología Facultad de Medicina Universidad Autónoma de Nuevo León
2008 – 2011	MC con acentuación en Inmunobiología Facultad de Ciencias Biológicas Universidad Autónoma de Nuevo León
2003 – 2007	Licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo Facultad de Ciencias Químicas Universidad Autónoma de Nuevo León

### ❖ Participación en congresos:

- Asistencia al “1° Curso teórico-práctico de Técnicas de Biología Molecular” organizado por la Facultad de Veterinaria y Zootecnia, UANL, Mayo 2008
- Asistencia al “3° Curso teórico-práctico de Bioinformática Aplicada” organizado por la Facultad de Ciencias Biológicas, UANL, Junio 2010
- Instructor en prácticas de “Técnicas básicas de biología molecular en artrópodos y plantas” en la Facultad de Ciencias Biológicas UANL, Mayo y Diciembre 2012
- Ponencia en formato cartel del proyecto “Antitumor effect of HPV-16 E7 antigen fused to a exotoxin A translocation domain secreted by Lactococcus lactis” en el 6° Simposio Internacional de Probióticos, Abril 2013.
- Ponencia en formato cartel del proyecto “Antitumor effect of HPV-16 E7 antigen fused to a exotoxin A translocation domain secreted by Lactococcus lactis” en el 12° International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms, Junio 2013.
- Asistencia al “1° Curso Teórico-Práctico de Citometría de Flujo” en la Facultad de Ciencias Biológicas, UANL, Abril 2014.
- Asistencia a “Actualización en Morfología” organizado por la Incubadora INVEST, Facultad de Medicina, UANL, Julio 2014
- Asistencia a 7° Simposio Internacional de Inmunoterapia en Cáncer y Enfermedades Infecciosas en la Facultad de Ciencias Biológicas, UANL, Noviembre 2014.
- Ponencia en formato cartel del proyecto “Evaluación del efecto antitumoral de una vacuna de ADN que codifica versiones modificadas de los antígenos E6 y E7 del HPV16 en un modelo

murino de cáncer cervicouterino” en el XXI Congreso Nacional de Inmunología organizado por la Sociedad Mexicana de Inmunología celebrado en Querétaro, Mayo 2014.

- Ponencia en formato cartel del proyecto “Efecto antitumoral de una vacuna de ADN que codifica antígenos del VPH flanqueados por señales de envío y retención en retículo endoplásmico” en el 4° Congreso de Cuerpos Académicos de Ciencias de la Salud UANL en la Facultad de Odontología, UANL, Octubre 2014.
- Asistencia a la capacitación “BD FACS Accuri C6 – Uso del equipo y aplicaciones” impartido en el Centro de Investigación Biomédica del Noreste, IMSS, Mayo 2015.
- Asistencia al “Curso Internacional de Avances en Investigación Vascular y de Mecanismos de Inflamación 2015” impartido por la Facultad de Medicina, UANL, Mayo 2015.
- Asistencia al “Curso-Taller: Combate de Incendios” impartido por la Facultad de Medicina, UANL, Junio 2015.
- Ponencia en formato oral del proyecto “Efecto antitumoral de una vacuna de ADN que codifica antígenos del VPH flanqueados por señales de envío y retención en retículo endoplásmico” en el XVI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería organizado por la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería, A.C., celebrado en Guadalajara, 2015.
- Ponencia en formato cartel del proyecto “Efecto antitumoral de una vacuna basada en el envío de antígenos en retículo endoplásmico” en el XXVIII Congreso Nacional de Investigación en Medicina celebrado en Nuevo León, 2015.
- Instructor de Taller en las actividades del Programa Mujeres en la Ciencia organizado por CONACYT celebrado en la Facultad de Medicina, UANL, Enero 2016.
- Asistencia a “Curso Internacional de Avances en Investigación vascular y programación fetal de la enfermedad cardiovascular” organizado por la Incubadora INVEST, Facultad de Medicina, UANL, Enero 2016.
- Asistencia a “Trabajando con el CICUAL” organizado por la Incubadora INVEST, Facultad de Medicina, UANL, Febrero 2016.
- Asistencia a “Producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999” organizado por la Incubadora INVEST, Facultad de Medicina, UANL, Marzo 2016.
- Ponencia oral en el tema de “Extracción de DNA” en el XXV Semestre de Actualización para los Químicos Clínicos organizado por la Facultad de Medicina, UANL, Marzo 2016.

#### ❖ **Reconocimientos:**

- Premio Dr. José Eleuterio González por mejor trabajo de investigación en la Facultad de Medicina, UANL 2015
- Premio a Estudiante distinguido inscrito en el programa de Doctorado en Ciencias con orientación en Morfología, 2013, 2014 y 2016.

❖ **Publicaciones:**

**Perez-Trujillo JJ**, Garza-Morales R, Garcia-Garcia A, Rocha-Rodriguez H, Garcia-Juarez J, Saucedo-Cardenas O, de-Oca-Luna RM, Loera-Arias MJ. A DNA vaccine encoding HPV antigens flanked by a signal peptide and a KDEL sequence induces a potent therapeutic antitumor effect. Accepted at Oncology Letters (Publicación en proceso)

**Perez-Trujillo JJ**, Figueroa-Parra G, Garza-Morales R, Rocha-Rodriguez H, Garcia-Garcia A, Saucedo-Cardenas O, de-Oca-Luna RM, Loera-Arias MJ. Vacunas terapéuticas contra el VPH: envío de antígenos a retículo endoplásmico. Ciencia UANL, Año 19, No. 79, Mayo-Junio 2016.

Sanchez-Lugo YE, **Perez-Trujillo JJ**, Gutierrez-Puente Y, Garcia-Garcia A, Rodriguez-Rocha H, Barboza-Quintana O, Muñoz-Maldonado GE, Saucedo-Cardenas O, de Oca-Luna RM, Loera-Arias MJ. CXCL10/XCL1 fusokine elicits in vitro and in vivo chemotaxis. Biotechnol Lett. 2014 Dec 17.